

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Impacto da concentração residual do inseticida ciantraniliprole em larvas da
abelha *Apis mellifera*: alterações histológicas e no estresse oxidativo**

Laryssa Lemos da Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

LARYSSA LEMOS DA SILVA

Impacto da concentração residual do inseticida ciantranilprole em larvas da abelha *Apis mellifera*: alterações histológicas e no estresse oxidativo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jose Eduardo Serrao

Coorientadora: Carolina Goncalves Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586i
2025 Lemos da Silva, Laryssa, 1998-
Impacto da concentração residual do inseticida
ciantraniliprole em larvas de abelha *Apis mellifera*: alterações
histológicas e no estresse oxidativo / Laryssa Lemos da Silva. –
Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (72 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2025.

Referências bibliográficas: f. 52-68.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.191>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Efeito dos inseticidas. 2. Ciantraniliprole
(Inseticida). 3. Estresse oxidativo. I. Serrão, José Eduardo,
1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Mestrado em Biologia Celular e Estrutural.
III. Título.

CDD 22. ed. 638.159

LARYSSA LEMOS DA SILVA

Impacto da concentração residual do inseticida ciantraniliprole em larvas da abelha *Apis mellifera*: alterações histológicas e no estresse oxidativo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Laryssa Lemos da Silva
Autora

Jose Eduardo Serrao
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 10/04/2025 às 20:32:33 e pelo orientador em 11/04/2025 às 07:44:14. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **R7GH.MM3N.11LV** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho aos meus pais, Conceição e Sérgio, por todo o suporte e interesse por este trabalho e ao meu cachorro e melhor amigo Fred, que me deixou cedo demais.

AGRADECIMENTOS

Os melhores espectadores e maiores torcedores das minhas conquistas e objetivos são meus pais, aqueles que me ligam todas as noites por vídeo chamada, que reclamam quando passo muito tempo sem os visitar e que sempre reafirmam que estão aqui por mim, independente do que aconteça. Obrigada mãe por tudo o que tem feito por mim, mas a senhora pode começar a descansar mais e a cuidar da saúde, não precisa mais ter essa rotina intensa para garantir que eu tenha o que preciso, ter você comigo já basta. Obrigada pai por mesmo sem entender nada de ecotoxicologia sentou e tentou calcular a dieta comigo e sempre que eu apresentava algum desafio você tentava do seu jeito pesquisar uma resposta para me ajudar.

Obrigada Fred, meu eterno melhor amigo, aquele que sempre esteve ao meu lado, que ficava sentido quando eu demorava mais que duas semanas para voltar para casa, que passava horas deitado ao meu lado enquanto eu estudava e que foi o primeiro a saber que passei no mestrado enquanto eu chorava de alegria. Nesses 17 anos e 5 meses você me ensinou outro significado para a palavra amor, lembra o que eu sempre te dizia quando voltava para Viçosa? O beijo na testa e enquanto te fazia carinho dizia olhando em seus olhos que eu te amo e que nunca te abandonaria porque não abandonamos quem amamos. Naquela quarta-feira eu sentia e sabia o que ia acontecer, você me ensinou mais uma coisa sobre o amor, você me ensinou que amar também é deixar quem amamos partir e sua ausência ainda dói. Você foi e sempre será o meu filhote.

Obrigada Álvaro e Giovanna por todo o companheirismo, risadas, abraços e cafés durante o mestrado. Obrigada por terem visto e acolhido uma Laryssa que tentei a todo custo esconder, obrigada por estarem lá. Mais do que um momento doce, aquele bolo azul de aniversário e o livro de colorir viraram uma daquelas lembranças que é impossível esquecer devido a todo o significado dela. Acho que somos mesmo “cabeças de algas”, mas com o diferencial que conseguimos nos comunicar sem precisar dizer uma palavra.

Agradeço ao meu orientador, José Eduardo Serrão, por toda a paciência e acolhimento durante esses anos, sei que dou trabalho quando fico ansiosa demais. Obrigada por me ouvir quando eu dizia o que me incomodava durante o desenvolvimento do projeto. Temos o privilégio de ter o senhor como orientador, sempre presente, nos guiando com toda a calma e paciência que só o senhor tem. Mais do que um mentor acadêmico, somos privilegiados por ter um orientador que senta
conosco

para tomar um café, conversar e rir das loucuras que aprontamos.

Gostaria de agradecer aos companheiros de laboratório de Ultraestrutura celular por todas as risadas e por tentarem responder às minhas inúmeras perguntas. Prometo que vou tentar parar de pensar demais e de fazer perguntas difíceis.

Por fim, agradeço a todos que fizeram essa pesquisa ser possível, a Universidade Federal de Viçosa pelo apoio, aos professores do departamento de Biologia Geral que de alguma forma contribuíram com a minha formação docente e as agências de financiamento pelo auxílio com a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao laboratório.

RESUMO

SILVA, Laryssa Lemos da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Impacto da concentração residual do inseticida ciantraniliprole em larvas da abelha *Apis mellifera*: alterações histológicas e no estresse oxidativo.** Orientador: Jose Eduardo Serrao. Coorientadora: Carolina Goncalves Santos.

Abelhas são importantes polinizadores que estão em declínio populacional devido a diversos estressores, incluindo os inseticidas. Novos inseticidas tendem a apresentar lacunas de conhecimento sobre a interação abelha-inseticida e seus efeitos tóxicos, principalmente os subletais. Ciantraniliprole é um inseticida da classe das diamidas antranílicas que interagem com os receptores de rianodina, liberando grandes quantidades de íons cálcio das células musculares, causando paralisia e morte dos insetos. Este estudo avaliou os efeitos da concentração residual de ciantraniliprole encontrado nos grãos de pólen (1,93 mg/kg) nos órgãos intestino médio, corpo gorduroso e sua relação com os marcadores relacionados ao estresse oxidativo em larvas de *Apis mellifera*. A exposição das larvas através da alimentação seguiu o protocolo da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) nº 239. Os resultados demonstram que a concentração de ciantraniliprole usada não altera o peso corporal, mas causam alteração no epitélio do intestino médio das larvas tratadas com o inseticida, incluindo desorganização da borda estriada, vacuolização citoplasmática, protusões apicais e liberação de fragmentos celulares para o lúmen. Além disso, o corpo gorduroso apresentou a ocorrência de picnose nuclear nas primeiras 72 horas de exposição ao inseticida. A histoquímica não indicou alteração na concentração de proteínas no intestino médio e corpo gorduroso, enquanto os polissacarídeos tiveram reação mais fraca na borda estriada do epitélio do intestino médio e aumento de concentração no corpo gorduroso das larvas tratadas com o inseticida. A concentração residual de ciantraniliprole aumentou a capacidade antioxidante total e a formação de proteínas carboniladas. Estes resultados indicam que o ciantraniliprole é capaz de produzir danos colaterais nos órgãos não alvo, intestino médio e corpo gorduroso e induzir o estresse oxidativo durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*, podendo comprometer aspectos fisiológicos e impactar esse importante polinizador.

Palavras-chave: histopatologia; pesticidas; estresse oxidativo; diamida

ABSTRACT

SILVA, Laryssa Lemos da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025.
Impact of residual concentration of the insecticide cyantraniliprole in larvae of the honey bee *Apis mellifera*: histological changes and oxidative stress.
Adviser: Jose Eduardo Serrao. Co-adviser: Carolina Goncalves Santos.

Bees are important pollinators whose populations are declining due to several stressors, including insecticides. New insecticides tend to present gaps in knowledge about bee-insecticide interactions and their toxic effects, especially sublethal ones. Cyantraniliprole is an insecticide of the anthranilic diamide class that interacts with ryanodine receptors, releasing large amounts of calcium ions from muscle cells, causing paralysis and death of insects. This study evaluated the effects of residual concentrations of cyantraniliprole found in pollen grains (1.93 mg/kg) on the midgut and fat body organs and its relationship with markers related to oxidative stress in *Apis mellifera* larvae. The larvae were exposed to food following the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) protocol no. 239. The results demonstrate that the concentration of cyantraniliprole used does not alter body weight, but causes changes in the midgut epithelium of larvae treated with the insecticide, including disorganization of the striated border, cytoplasmic vacuolization, apical protrusions and release of cell fragments into the lumen. In addition, the fat body showed nuclear pyknosis in the first 72 hours of exposure to the insecticide. Histochemistry did not indicate changes in the concentration of proteins in the midgut and fat body, while polysaccharides had a weaker reaction in the striated border of the midgut epithelium and increased concentration in the fat body of larvae treated with the insecticide. The residual concentration of cyantraniliprole increased the total antioxidant capacity and the formation of carbonyl proteins. These results indicate that cyantraniliprole is capable of producing collateral damage in non-target organs, midgut and fat body and inducing oxidative stress during the post-embryonic development of *A. mellifera*, which may compromise physiological aspects and impact this important pollinator.

Keywords: histopathology; pesticides; oxidative stress; diamide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Abelhas e o declínio de polinizadores.....	9
1.2 Desenvolvimento pós-embriónico.....	10
1.3 Corpo gorduroso e Intestino médio.....	12
1.4 Ciantraniliprole e o uso de inseticidas.....	14
2 OBJETIVO.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta das larvas.....	18
3.2 Exposição ao inseticida.....	18
3.3 Histopatologia.....	20
3.4 Histoquímica.....	20
3.4.1 Mercúrio de Bromofenol - Proteínas.....	20
3.4.2 Ácido periódico-Schiff (PAS) – Polissacarídeos neutros.....	20
3.4.3 Quantificação dos componentes químicos.....	21
3.5 Estresse oxidativo.....	21
3.5.1 Catalase.....	21
3.5.2 Superóxido dismutase.....	22
3.5.3 Proteínas carboniladas.....	22
3.5.4 Óxido nítrico.....	23
3.5.5 Capacidade antioxidante total.....	23
3.6 Estatística.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Peso das larvas.....	25
4.2 Histopatologia.....	25
4.3 Histoquímica.....	32
4.4 Estresse oxidativo.....	44
5 DISCUSSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
APÊNDICE.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Abelhas e o declínio de polinizadores

Hymenoptera surgiu no Triássico há cerca de 230 milhões de anos e conta atualmente com, aproximadamente, mais de um milhão de espécies, sendo tradicionalmente dividida em dois grupos: Symphyta, com cerca de 5% dos himenópteros existentes, e Apocrita, representando aproximadamente 96% das espécies como vespas, formigas e abelhas (Huber, 2017; Gokhman, 2023). As abelhas com sua ampla distribuição global e riqueza de espécies (Orr et al., 2021) contribuem para a polinização de 90% das culturas globais (Feketéné et al., 2023), uma relação que iniciou no Cretáceo e gera impactos em quase todos os ecossistemas terrestres (Almeida et al., 2023).

Em termos econômicos, a polinização global por animais atinge a média de 153 bilhões de euros (Khalifa et al., 2021). No Brasil, os serviços prestados pelos polinizadores correspondem a cerca de 12 bilhões de dólares anualmente (Abati et al., 2021). Considerando parte da América Latina, o valor desse serviço prestado pelas abelhas nos anos de 2013 a 2018 chegou a US\$ 22.95 bilhões (Basualdo et al., 2022), enquanto no cenário nacional o montante atingiu o valor de US\$ 810.000 em 2016, considerando apenas áreas protegidas das regiões norte e sudeste (Khalifa et al., 2021). Além da polinização, as abelhas também produzem mel, própolis, geleia real, cera e apitoxina com importância alimentar e farmacológica (Sonmez et al., 2023; Bava et al., 2024).

Dentre as abelhas, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) é um polinizador economicamente importante em todo o mundo, principalmente para monoculturas em grande escala, por influenciar a qualidade e a quantidade de colheitas (Khalifa et al., 2021; Feketéné et al., 2023). Sua importância nesse cenário tem relação com o nível de domesticação, que começou no Egito (Weber, 2013), o número de indivíduos, a facilidade no transporte e a acessibilidade a esses organismos (Klein et al., 2007; Khalifa et al., 2021).

O declínio de insetos polinizadores tem sido alvo de diversos estudos, indicando que esse evento tem múltiplas causas: a falta de alimentos e habitats para nidificação; as mudanças climáticas; uso de produtos químicos; doenças e as monoculturas que levam ao estresse nutricional (Ravinder et al., 2023). Com relação à *A. mellifera*, entre 2006 e 2007 ocorreu o Colony Colapese Disorder (CCD) que afetou de 50-90% das colônias nos Estados Unidos da América, sendo caracterizado pelo desaparecimento de abelhas adultas de colônias contendo crias e estoques de alimentos, mas sem níveis prejudiciais de parasitas como *Varroa destructor* Anderson e Trueman, 2000 (Mesostigmata: Varroidae) ou microsporídeos do gênero *Nosema* Nägeli, 1857 (Dissociodihaplophasida: Nosematidae) (VanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010). Porém, não se tratava de um evento pontual, uma vez que as perdas de colônias continuaram nos anos seguintes, atingindo, anualmente, 40% das colônias de 2018 a 2020 (Bruckner et al., 2023), 50,8% no período de 2020 a 2021 e 39,0% de 2021 a 2022 (Aurell et al., 2023). O colapso de colônias não se restringiu apenas àquele país, sendo também documentado para outros países da América do Norte, do Sul, Europa, Ásia, África e Oceania (Antúnez et al., 2017; Pervez et al., 2022; Yang et al., 2023).

1.2 Desenvolvimento pós-embrionário

Abelhas são insetos holometábolos que passam por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Cruz Landim, 2009). Após a eclosão do ovo inicia-se o período pós-embrionário, marcado pelo crescimento descontínuo da larva, envolvendo a troca de cutícula e a obtenção de uma nova forma denominada instar. Geralmente a mudança mais marcante no corpo do inseto ocorre entre a última muda larval e o adulto, momento em que ocorre a metamorfose para a aquisição de características do inseto adulto (Champan, 2013).

As larvas de abelhas são ápodas, eucéfalas e com tegumento pouco esclerosados (Cruz Landim, 2009). Durante o desenvolvimento larval, a alimentação permite às larvas atingirem reservas nutritivas e um tamanho similar ao que será o futuro adulto. Esse período é

dividido em cinco instares com especificações para o diâmetro da cápsula cefálica e do peso corporal (Michelette e Soares, 1993). Operárias de *A. mellifera* africanizada passam cerca de 17 horas no primeiro instar (L1), 20 horas no segundo (L2), terceiro (L3) e quarto instar (L4) e 110 horas no quinto instar (L5), sendo o último instar o período em que o intestino é esvaziado e o casulo é tecido para a pupação (Michelette e Soares, 1993)

Insetos holometábolos adquirem as características de adulto durante o período de pupa, as estruturas que estavam sendo desenvolvidas internamente, como as asas e os apêndices, são evertidas e continuam o desenvolvimento externamente (Chapman, 2013). Na maioria dos insetos a pupa fica imóvel e dentro de uma célula ou casulo que confere proteção, essa estrutura é construída, geralmente, com material produzido pelas glândulas salivares das larvas (Silva-Zacarin et al., 2008). Em *A. mellifera*, o período de pupação tem duração de cerca de oito dias, podendo ser identificado sete fases de desenvolvimento conforme a coloração dos olhos e do tórax (Michelette e Soares, 1993).

Após a emergência dos adultos, com o passar dos dias as abelhas adquirem diferentes funções dentro da colônia até que possam sair em busca de pólen e néctar. Em *A. mellifera* as abelhas nutridoras são responsáveis por alimentar as larvas, as demais abelhas da colônia e cuidar da rainha (Johnson, 2010). Durante os primeiros três dias, todas as larvas recebem geleia real, um composto rico em proteínas, lipídeos e carboidratos, sendo o pólen a fonte de lipídeos e proteínas para a produção da geleia real pelas glândulas hipofaríngeas das operárias (Böhme, et al. 2018). Após esse período, as larvas de operárias são alimentadas com uma mistura de geleia real, pólen e mel, tendo uma qualidade nutricional menor do que o alimento fornecido às larvas destinadas a serem rainhas (Wang et al., 2016), além de um volume menor de alimento (Slater et al., 2020).

Nas larvas os órgãos mais desenvolvidos são o intestino médio e o corpo gorduroso, envolvidos com a alimentação, reserva energética e o centro do metabolismo intermediário

das larvas, respectivamente. Durante este estágio de desenvolvimento, o intestino médio não apresenta modificações anatômicas, sendo composto pelos enterócitos (células digestivas), células regenerativas e endócrinas. Já o corpo gorduroso é dividido em parietal, abaixo do tegumento, e perivisceral, próximo aos órgãos, composto principalmente por trofócitos. Com o desenvolvimento larval, a porção perivisceral apresenta células maiores que o parietal e um aumento na reserva de carboidratos, proteínas e lipídios devido ao acúmulo de compostos armazenados oriundos da alimentação (Cruz Landim, 2009; Roma et al., 2010.)

Durante o processo de metamorfose os insetos passam por uma remodelação tecidual que envolve morte celular, mudança no formato celular e adição de novas células para a formação das estruturas necessárias no indivíduo adulto. Com relação ao intestino médio, durante o desenvolvimento larval a passagem entre o intestino médio e posterior permanece fechada, abrindo no final do quinto instar (Gonçalves et al., 2017). Com a eliminação do bolo fecal (*meconium*), a parede do intestino médio colapsa e a reorganização tecidual inicia com partes do epitélio sendo liberado para o lúmen intestinal. Os enterócitos são repostos aos poucos pelas células regenerativas. Este processo de reorganização perdura por toda a fase de pupação até que todo o epitélio intestinal tenha sido renovado (Martins et al., 2006; Cruz Landim, 2009). Já no corpo gorduroso, as modificações na metamorfose alteram sua forma, tamanho e função por meio de processos como a morte celular programada e desorganização tecidual (Santos et al., 2015, Li et al., 2019). Com a dissociação celular, alguns trofócitos são rompidos liberando seu conteúdo na hemolinfa e os nutrientes armazenados são usados para a formação e crescimento de novos tecidos nos insetos adultos (Cruz Landim, 2009; Li et al., 2019). O que permanece do corpo gorduroso no adulto são poucos trofócitos, principalmente da porção parietal do órgão (Cruz Landim, 2009).

1.3 Corpo gorduroso e Intestino médio

O canal alimentar dos insetos é dividido em três porções: intestino anterior, médio e posterior, tendo diferentes funções, características e origens embrionárias (Chapman, 2013). O

tubo digestório é composto por um epitélio simples sustentado por uma membrana basal e circundado por duas camadas musculares, a interna circular e a externa longitudinal. Devido a sua origem ectodérmica, os intestinos anterior e posterior têm uma cutícula luminal, diferentemente do intestino médio que tem origem endodérmica e não apresenta cutícula (Cruz Landim, 2009).

O intestino médio das abelhas é formado por um epitélio simples com células prismáticas e borda estriada. Existem diferentes tipos de células no intestino: os enterócitos, ou células digestivas, cuja função é a de produção de enzimas digestivas, componentes da matriz peritrófica e absorção de nutrientes; às células regenerativas presentes na base do epitélio, organizadas em pequenos agrupamentos denominados ninhos e tendo como função a reposição dos enterócitos e as células endócrinas que intercalam com os enterócitos e atuam no controle do processo digestório através da secreção de peptídeos hormonais (Cruz Landim, 2009; Santos, 2022). Devido a sua participação na produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio e regulação da microbiota intestinal, o intestino médio é considerado o segundo órgão imunológico, sendo o corpo gorduroso considerado o principal nessa função (Caccia, et al. 2019).

Protegendo o epitélio intestinal do atrito com o alimento no lúmen existe uma barreira formada por camadas concêntricas, a matriz peritrófica, composta por uma rede de fibrilas de quitina imersas em uma matriz proteica que, em Hymenoptera, é produzida ao longo de todo o intestino médio (Marques-Silva et al., 2005, Teixeira et al., 2015). Outras funções da matriz envolve a delimitação do local de ação de enzimas hidrolíticas, evitar o contato de patógenos com o epitélio intestinal (Caccia, et al. 2019) e toxicidade química associada a ingestão de alimento (Guo et al., 2019; Hegedus et al., 2019).

O corpo gorduroso é um tecido que preenche as cavidades dos insetos, sendo composto por trofócitos que estão em contato direto com a hemolinfa, mas também podendo

estar presente os urócitos, trofócitos especializado no armazenamento de uratos (Chapman, 2013; Furtado et al., 2013). Os trofócitos são as principais células do corpo gorduroso, atuando no armazenamento de proteínas, lipídeos e carboidratos, ajudando a suprir as necessidades metabólicas imediatas do inseto. O nível de reserva acumulada nesse órgão coordena o desenvolvimento do inseto, o momento da metamorfose e o desenvolvimento do ovo (Arrese e Soulages, 2010). No corpo gorduroso das abelhas é comum a ocorrência de outro tipo celular, os enócitos, que são células grandes com citoplasma acidófilo que ficam espalhadas entre os trofócitos, sendo responsáveis pela produção de hidrocarbonetos incorporados na epicutícula (Cruz Landim, 2009).

O corpo gorduroso é o centro do metabolismo intermediário dos insetos, atuando no metabolismo de lipídeos, carboidratos, nitrogênio e na síntese de proteínas, como, por exemplo, a vitelogenina (Arrese e Soulages, 2010). Este órgão é um local importante para processos de desintoxicação dos insetos, com ação das enzimas glutathione S-transferases (GSTs), monooxigenases P450 (P450s, CYPs) e carboxilesterase (CarEs) (Zhao et al., 2020), e atuação na imunidade inata dos insetos produzindo peptídeos antimicrobianos (AMPs) e peptídeos que contribuem para a fagocitose de hemócitos (Li et al., 2019).

1.4 Ciantraniliprole e o uso de inseticidas

O primeiro registro do uso de inseticidas para o controle de populações de insetos foi a cerca de 4.500 anos atrás pelos Sumérios (Araújo et al., 2023), atualmente, o consumo global está na escala de quase 2 milhões de toneladas por ano (Sharma, A. et al. 2019; Rajan et al., 2023). O Brasil, em 2018, ocupava a quinta posição entre os países que mais usaram inseticidas (Sharma, A. et al. 2019), em 2020 o país atingiu a segunda posição, com um total de 0,377 milhões de toneladas de inseticidas utilizados (Rajan et al., 2023). Com os produtores visando o aumento de suas colheitas e diminuir suas perdas no campo, como os inseticidas são uma fonte rápida e prática para o controle de insetos pragas, a tendência é se usar cada vez mais inseticidas nas plantações (Araújo et al., 2023).

Apesar de terem como alvo determinados organismos, os inseticidas podem agir indiretamente em organismos não alvos, afetando diferentes aspectos de sua fisiologia (Serrão et al., 2022). No Brasil, o uso indiscriminado de pesticidas é tido como o principal agente relacionado a perda de colônias de *A. mellifera* e abelhas nativas (Castilhos et al., 2019). Durante a coleta de recursos, as abelhas podem percorrer 9,5 km (Beekman e Ratnieks, 2000), e às vezes até mais que 15 km (Janzen, 1971; Couvillon et al., 2014; Grüter e Hayes, 2022), estando expostas às rotas de contaminação por inseticidas envolvendo partículas presentes no ar, compostos coletados como néctar, pólen e resina e contato com fluidos de gutação (Zioga, et al., 2020).

A exposição aos inseticidas pode gerar efeitos letais levando a morte, ou efeitos subletais, com mudanças comportamentais, bioquímicas e fisiológicas dos insetos (Serra et al., 2021; Ibrahim et al., 2023), alterando sua atividade motora, alimentação, desenvolvimento, sistema reprodutor, aprendizagem, memória, mecanismos enzimáticos e imunidade (Murawska et al. 2021). A exposição aos inseticidas pela rota envolvendo o consumo de pólen e néctar é comum e tem alto impacto sobre a colônia. Como as operárias forrageiras transportam esses materiais para a colônia, o contato com as provisões armazenadas e outros materiais da colmeia pode expor toda a colônia ao inseticida (Zioga, et al., 2020). Uma forma de se analisar uma exposição realista de campo é através das concentrações residuais de inseticidas presente no pólen e no néctar, que fazem parte da alimentação de toda a colônia e podem gerar efeitos subletais nas abelhas (Mullin et al., 2010; Zioga, et al., 2020; Wang et al., 2022).

Apesar do foco dos estudos com inseticida ainda ser com indivíduos adultos, nos últimos anos tem se observado um aumento no número de pesquisas envolvendo a interação de inseticidas com as larvas de abelhas, analisando, por exemplo, como o xenobiótico afeta as rotas metabólicas (Derecka et al. 2013), o desenvolvimento larval (Wade et al. 2019; Kast e

Kilchenmann, 2022; Li et al., 2024), o estresse oxidativo e a expressão gênica (Qi et al., 2020; Lu et al., 2023). O consumo de pesticidas durante o estágio larval pode afetar o desenvolvimento do adulto e seus processos de aprendizagem e memória (Dorneles et al., 2021; Ke et al., 2023) e capacidade de absorver e estocar nutrientes (Carneiro et al., 2023). Estudos envolvendo esse estágio de vida do organismo são importantes, uma vez que as larvas serão as próximas gerações de abelhas adultas que atuarão na manutenção e sobrevivência da colônia.

Dentre os inseticidas, a classe dos neonicotinóides e piretróides, inseticidas que atuam no sistema nervoso e nos músculos, respectivamente, apresentam amplo uso no mercado global devido ao seu efeito contra um amplo espectro de insetos pragas (Aznar-Alemany e Eljarrat, 2020; Klingelhöfer et al., 2022). Novas classes de inseticidas desenvolvidos para serem alternativas aos neonicotinóides e piretróides buscam diminuir os riscos para o ambiente e para organismos não alvos, principalmente os polinizadores (El-Sheikh e Ashour, 2022).

Ciantroniliprole, também conhecido como Cyazypyr® ou Benevia®, é um inseticida de segunda geração da classe das diamidas antranílicas desenvolvido pela DuPont e amplamente usado nos últimos anos (El-Sheikh e Ashour, 2022; Mantzoukas et al., 2022). Inseticidas diamidas atuam nos receptores de rianodina, liberando grandes quantidades de íons cálcio das células musculares, fazendo com que o músculo esteja continuamente contraído, levando a paralisia e eventualmente a morte do inseto (Cordova et al., 2006; El-Sheikh e Ashour, 2022). Esse inseticida é de ação sistêmica na planta e por ingestão e contato nos insetos, agindo sobre um amplo espectro de insetos pragas, incluindo representantes de Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera e Thysanoptera (Barry et al., 2015; Pes et al., 2020). Por atuarem nos receptores rianodina, as diamidas podem afetar os fotorreceptores, músculos, cérebro e coração das abelhas (Kadala et al., 2019). Além disso,

como esses receptores controlam a liberação de cálcio intracelular, de forma indireta o inseticida pode afetar diferentes rotas de sinalização, incluindo a expressão gênica (Kadala et al., 2019).

Com relação à toxicidade do ciantraniliprole para *A. mellifera*, testes conduzidos com diferentes formulações do inseticida sendo usadas como spray indicam que é de baixo risco para as abelhas adultas (Dinter e Samel, 2015; Costa et al., 2024). Já as formulações inseridas na dieta apresentam maior toxicidade e alto risco para as abelhas, tanto em estágio larval, quanto em adultos (Kim et al., 2022; Costa et al., 2024). Segundo o relatório apresentado pela European Food Safety Authority (EFSA), ainda existe necessidade de mais estudos para análise dos riscos da exposição do ciantraniliprole nas abelhas, tendo como recomendação evitar o uso do inseticida durante os horários de voo destes insetos (EFSA, 2014). Por ser uma classe relativamente nova de inseticida, existem poucos estudos analisando o impacto do ciantraniliprole nas abelhas, especialmente nas larvas e seus efeitos subletais.

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito histopatológico no intestino médio e corpo gorduroso e no estresse oxidativo de larvas da abelha *A. mellifera* após a ingestão crônica do inseticida ciantraniliprole na concentração residual encontrada nos grãos de pólen.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das larvas

Larvas de primeiro instar de *A. mellifera* africanizada foram coletadas de quadros de crias de cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O) e transferidas para o laboratório onde foram mantidas a 34 ± 1 °C e $95\% \pm 5\%$ de umidade relativa. As colônias estavam sadias, sem sinais de infestação por patógenos e mantidas em área próxima à fragmento de Mata Atlântica com diversidade de plantas fornecendo recursos alimentares poliflorais em área livre de uso de pesticidas.

3.2 Exposição ao inseticida

A avaliação do efeito do inseticida nas larvas foi realizada através de bioensaios com 226 larvas de *A. mellifera* no primeiro instar, sendo 113 para controle e 113 para o tratamento com a formulação de ciantraniliprole (BENEVIA®, 100,00 g/L do ingrediente ativo e 871,55 g/L de outros ingredientes, FMC, São Paulo, Brasil), seguindo as orientações descritas pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 239, 2016). As larvas foram coletadas e transferidas para células de cria artificiais (9 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade) com 20 µL de dieta. As células de cria estavam acomodadas em placas de cultivo de 48 poços com algodão umedecido com solução esterilizante (15% p/v glicerol e cloreto de benzetonio a 0,2% p/v). A dieta larval consistiu em 50% de solução de açúcares (D-frutose, D-glicose e extrato de levedura) e 50% de geleia real para o controle (OECD 239, 2016), sendo as mesmas proporções para o tratamento, mas acrescido de inseticida (Tabela 1). Posteriormente, as placas foram transferidas para dessecador selado e mantidas a 34 ± 1 °C e $95 \pm 5\%$ de umidade relativa. No primeiro dia todas as larvas receberam dieta livre de inseticida e não foram alimentadas no segundo dia conforme o protocolo da OECD. Do terceiro ao sexto dia do bioensaio, uma vez ao dia, as larvas foram alimentadas com dieta artificial pura para as do controle e as do tratamento com dieta composta por 50% de geleia real e 50% da solução de açúcares, extrato de levedura e inseticida conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Dieta oferecida diariamente para larvas de *Apis mellifera* africanizada (OECD 239, 2016), com as proporções de ciantraniliprole.

Dia	Volume de alimento/Larva (µL)	Levedura (p/p)	D-Glicose (p/p)	D-Frutose (p/p)	Geleia real (p/p)	Ciantraniliprole 6,52x10⁻⁸ (g/mL)
1	20	2	12	12	50	-
2	-	-	-	-	-	-
3	20	3	15	15	50	9,32x10 ⁻⁹
4	30	4	18	18	50	1,39x10 ⁻⁸
5	40	4	18	18	50	1,86x10 ⁻⁸
6	50	4	18	18	50	2,33x10 ⁻⁸

As concentrações crescentes de ciantraniliprole foram proporcionais ao volume diário de cada dieta, considerando que ao final do experimento a concentração acumulada foi de 6,52x10⁻⁵ g/L. Para os cálculos foi considerado a concentração residual de 1,933 mg/kg de ciantraniliprole encontrado em grãos de pólen (Dinter e Samel, 2015) e o consumo total de pólen durante a fase larval de 5,4 mg (Rortais et al., 2005) com a equação de Tadei et al., (2020):

$$Cd = \frac{Cp \cdot Pc}{Vd}$$

Onde, Cd = concentração estimada de inseticida na dieta (ng/mL), Cp = concentração encontrada no pólen (ng/g), Pc = quantidade total de pólen consumida durante a fase larval (g) e Vd = volume total da dieta consumida durante a fase larval (mL).

3.3 Histopatologia

A partir do terceiro dia até o sexto dia de exposição, cinco larvas foram coletadas diariamente, do grupo controle e do tratamento, e as remanescentes foram alimentadas com as concentrações diárias de ciantranilprole descritas na Tabela 1, para análise da histopatologia com 12h, 24h, 48h, 72h e 96h de exposição ao inseticida.

As larvas foram pesadas em balança analítica, seguidas da retirada das extremidades do corpo, e transferência para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) por 10 min em cada concentração. As amostras foram embebidas em historesina (Leica) conforme instruções do fabricante, cortadas em micrótomo com 3 µm de espessura, coradas com hematoxilina (15 min), eosina (30 s), analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX53.

3.4 Histoquímica

As larvas de *A. mellifera* fixadas em Zamboni tiveram algumas secções histológicas não sequenciais contendo o intestino médio e o corpo gorduroso submetidas aos testes histoquímicos descritos a seguir para detecção de proteínas totais, polissacarídeos neutros e glicoconjugados.

3.4.1 Mercúrio de Bromofenol - Proteínas

As amostras foram transferidas para solução de mercúrio de bromofenol (100 ml de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bromofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio) por 2h15 min. Posteriormente, foram lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min e analisadas em microscópio de luz.

3.4.2 Ácido periódico-Schiff (PAS) – Polissacarídeos neutros

As amostras foram transferidas para ácido periódico 0,4% e mantidas durante 30 min, lavadas em água destilada e expostas ao reativo de Schiff (Bancroft e Gamble 2008)

durante uma hora no escuro. Após esse período, as amostras foram lavadas em água corrente por 30 min e analisadas em microscópio de luz.

3.4.3 Quantificação dos componentes químicos

Após analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX 53 com objetiva de 40X e abertura numérica de 0.75. Dez imagens do intestino médio e do corpo gorduroso de cada larva (cinco larvas por período de exposição) submetidas aos testes de PAS e mercúrio bromofenol tiveram a intensidade das reações analisadas em cinco regiões aleatórias com áreas de 64x64 pixels utilizando o software ImageJ/FIJI. As intensidades das reações foram medidas usando a intensidade dos valores de cinza das imagens após terem seus valores de pixels convertidos da escala de cores RGB para a escala de cores de cinza (Urstadt, 2022; Reis et al., 2024b).

3.5 Estresse oxidativo

Para a análise de estresse oxidativo 130 larvas (65 controles e 65 tratadas) de *A. mellifera* foram aleatoriamente coletadas após 12 h (n = 13), 24 h (n= 13), 48 h (n = 13), 72 h (n = 13) e 96 h (n = 13) de exposição ao inseticida, tendo o mesmo número de amostras para o grupo controle. As larvas foram colocadas individualmente em microtúbulos de 2,0 mL com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 (PBS) e homogeneizadas com homogeneizador Tissue Master 125 (Omni International, Kennesaw, EUA). As amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi usado para análise de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo. A concentração de proteína foi determinada a partir do método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão e leitura de absorvância a 595 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro.

3.5.1 Catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo método de reação de peróxido de hidrogênio não decomposto com molibdato de amônio (Hadwan e Abed, 2016). Resumidamente, 5 µL de amostra foi adicionada para 100 mL de peróxido de hidrogênio 40

mM e após 3 minutos, a reação foi inibida por 150 μL de molibdato de amônia 32 mM. A seguir o complexo amarelo de molibdato e peróxido de hidrogênio foi avaliado a 374 nm de comprimento de onda em relação ao branco e atividade expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.5.2 Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi analisada baseada na dismutação de radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reduzindo a auto-oxidação do pirogalol (Marklund e Marklund, 1974). Para essa reação foram utilizados 10 μL de amostra com 170 μL de PBS em microplaca de poliestireno. A reação teve início com a adição de 20 μL de pirogalol a 1 mM e após 3 minutos, a reação final foi medida pela absorvância a 320 nm de comprimento de onda. A atividade foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

2.5.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada considerando a reação do malondealdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) formando um composto que foi quantificado por espectrometria a 532 nm de comprimento de onda (Buege e Aust, 1978). Para a reação, foram utilizados 50 μL de amostra com 400 μL de solução de TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 0,25 M), essa mistura foi agitada em vórtex por 10s, aquecida em banho maria por 1 hora a 90°C. A seguir foram adicionados 450 μL de n-butanol, seguido de centrifugação a 5000 x g por 10 min e o sobrenadante resultante teve sua absorvância analisada em um espectrofotômetro. A concentração de MDA foi expressa em micro molar por miligrama de proteína ($\mu\text{M}/\text{mg}$).

3.5.3 Proteínas carboniladas

A oxidação de proteínas foi analisada através da concentração de proteínas carboniladas pelo método DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazina a 10mM; Levine et al., 1990).

Foram utilizados 50 μL de amostra incubadas com 500 μL de uma solução de DNPH a 10 mM em 2M de HCl, agitadas em vórtex e incubados no escuro por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético a 40% e centrifugação a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Os precipitados foram lavados com 1 mL de solução de etanol: acetato de etila (1:1), centrifugados 10000 x g por 10 minutos a 4°C, novamente lavados com 1 mL de uma solução de etanol: acetato de etila e centrifugados a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado final foi suspenso em 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 6%, centrifugados a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante teve a absorbância medida a 370nm de comprimento de onda. A carbonilação proteica foi expressa em nmol/mg de proteína.

3.5.4 Óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada usando o método de Griess (Tsikas, 2007). Em 50 μL da amostra foram adicionados 100 μL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H_3PO_4 2,5%, naftiletieno amida dihidroclorido 0,1% em H_3PO_4 2,5%), com leitura da absorbância a 570 nm de comprimento de onda após 10 min. A concentração de NO foi expressa em μM /mg de proteína.

3.5.5 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (TAC) foi medida usando o método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP; Benzie e Strain, 1996). Em 10 μL de amostras, foram adicionados 190 μL da solução FRAP [tampão acetato 30 mM pH 3,6; 2,4,6-Tris-s-triazine (TPTZ) 10 mM em HCl 40Mm; cloreto férrico (III) hexahidratado (BDH) 20 mM], incubados por 30 minutos no escuro seguido de medida da absorbância a 593nm de comprimento de onda. O potencial antioxidante das amostras foi determinado utilizando a quantidade em μM de Fe_2^+ .

3.6 Estatística

O peso das larvas de cada grupo, os dados obtidos pela quantificação de píxel dos testes histoquímicos, e os dados de estresse oxidativo foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As amostras que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade foram submetidas ao teste não paramétrico U-Mann Whitney, enquanto as amostras paramétricas ao teste t-Student. Nas análises de estresse oxidativo, os outliers extremos foram removidos antes dos testes estatísticos. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, versão 4.4.2, 2024) com 5% de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Peso das larvas

Larvas de operárias de *A. mellifera* expostas à concentração residual de ciantraniliprole presente no pólen apresentaram pesos semelhantes aquelas do controle após 96 h, correspondendo ao último instar do desenvolvimento larval ($W = 252$, $p = 0.4641$; Fig. 1).

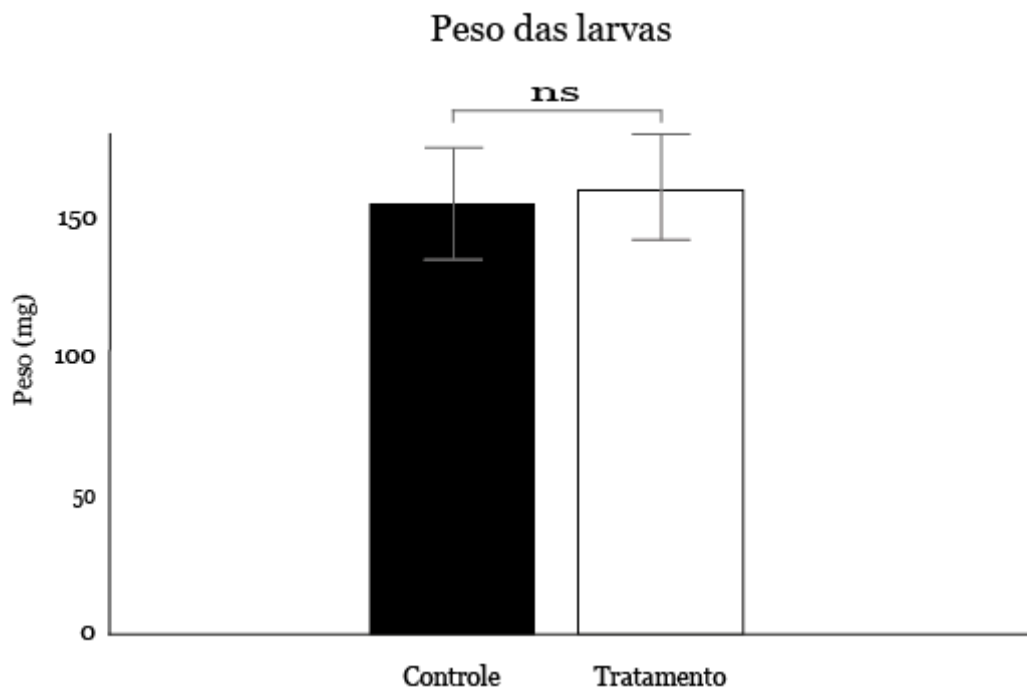


Figura 1: Peso (média \pm SD) de larvas de *A. mellifera* do grupo controle e tratamento com ciantraniliprole em 96 horas. ns – não significativo pelo teste Mann Whitney ($p = 0.4641$).

4.2 Histopatologia

Larvas de operárias de *A. mellifera* do grupo controle apresentaram intestino médio com epitélio simples formado por células cúbicas com núcleo rico em cromatina descondensada, borda estriada apical uniforme e bem desenvolvida (Fig. 2A-E) e a presença de ninhos de células regenerativas na porção basal do epitélio (Fig. 2C-E).

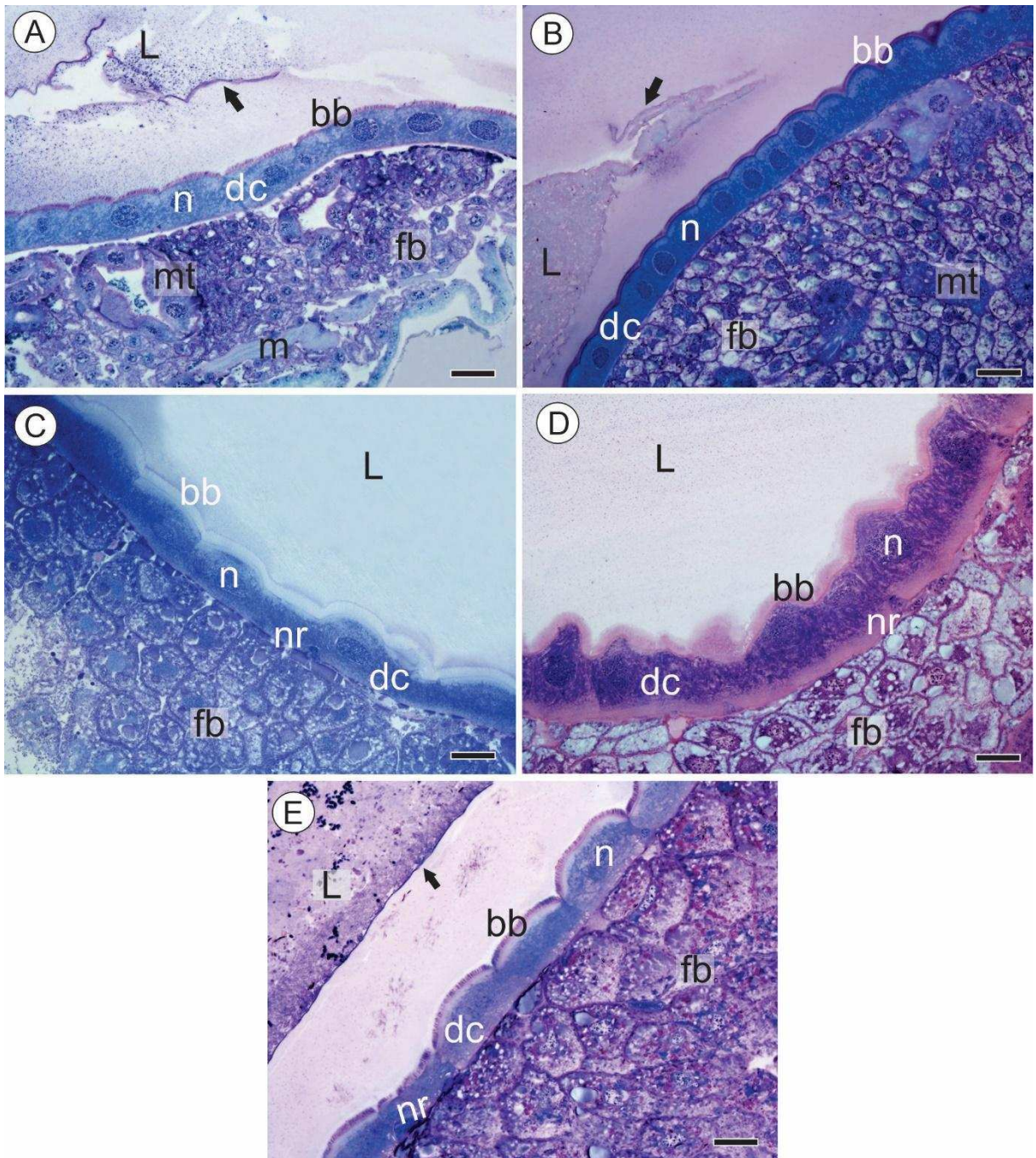


Figura 2: Micrografias de luz do intestino médio de larvas controle de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento mostrando o epitélio formado pelas células digestivas (dc), núcleos com cromatina descondensada (n), borda estriada desenvolvida (bb), ninhos de células regenerativas (nr) e a matriz peritrófica (seta preta). fb: corpo gorduroso, L: lúmen; m: músculo, mt: túbulos de Malpighi. A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala = 50 μ m.

As larvas tratadas com dieta contendo ciantraniliprole apresentaram danos histopatológicos no epitélio do intestino médio ao longo de todo o experimento. Com 12 horas de exposição o epitélio intestinal apresentou desorganização da borda estriada e o início da formação de protusões citoplasmáticas apicais (Fig. 3A). A partir de 24 horas de exposição as protusões citoplasmáticas foram comuns ao longo do epitélio intestinal (Fig. 3B), e com 48 horas iniciou-se a perda de contato celular com o epitélio, vacuolização citoplasmática e liberação de fragmentos celulares para o lúmen (Fig. 3C). Com 72 horas de exposição ao inseticida a desorganização do epitélio continuou com a presença de fragmentos celulares e secreção apócrina (Fig. 3D). Em 72 horas e 96 horas alguns ninhos de células regenerativas apresentaram vacúolos e ocasionalmente picnose nuclear (Fig. 3E) e com 96 horas o epitélio intestinal ainda apresentava vacuolização citoplasmática e protusões citoplasmáticas (Fig. 3F).

O corpo gorduroso das larvas controle foi composto majoritariamente por trofócitos, caracterizados por um núcleo central com cromatina descondensada, e citoplasma rico em gotas lipídicas. Estas células aumentam seu tamanho e a abundância de gotículas lipídicas com o decorrer do desenvolvimento larval (Fig. 4A-E). Além dos trofócitos, ocorreram alguns enócitos, células esféricas de contorno bem definido com citoplasma uniformemente basófilo e núcleo com cromatina descondensada (Fig. 4A), sendo também encontrados ocasionalmente, com o avanço do desenvolvimento, urócitos, células com núcleo rico em cromatina descondensada e citoplasma preenchido com depósitos de urato (Fig. 4C e E).

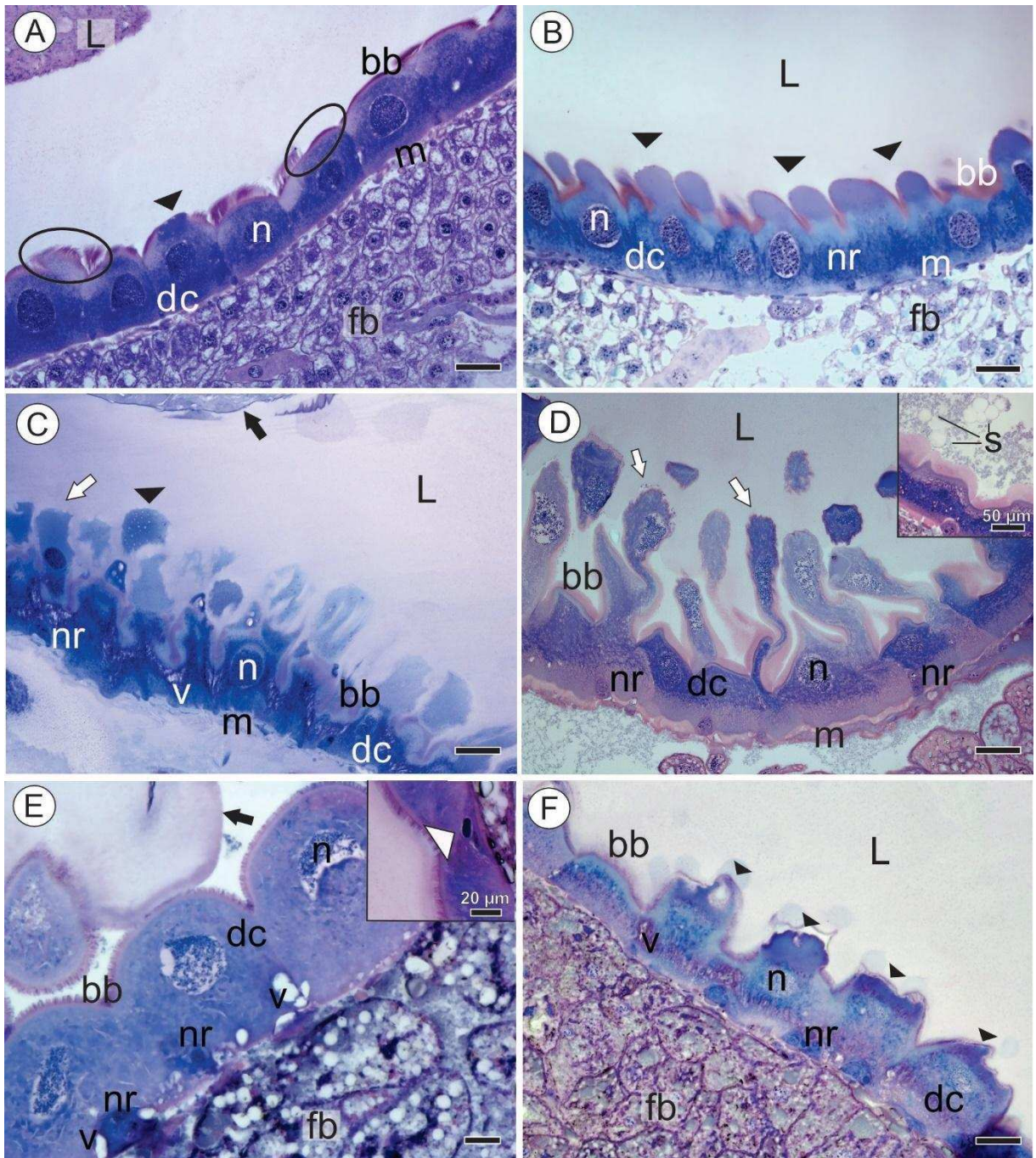


Figura 3: Micrografias de luz do intestino médio de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento exposta ao inseticida ciantraniliprole. A) alterações na borda estriada (círculo) e formação de protrusão apical (ponta de seta). B) aumento no número de protusões apicais (ponta de seta). C) liberação de fragmento celular (seta branca), protrusão (ponta de seta) e vacuolização citoplasmática (v). D) liberação de fragmentos celulares (seta branca) e secreção apócrina (S). E) A partir de 72 horas ninhos de células regenerativas (nr) com vacúolos (v) e eventualmente picnose nuclear (ponta de seta branca). F) Vacuolização citoplasmática e protrusão citoplasmática (ponta de seta). dc: célula digestiva, fb: corpo

gorduroso, L: lúmen, m: músculo, n: núcleo, seta: matriz peritrófica. A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 72 h e 96 h; F) 96 h. Barras de escala A-D, F= 50 μm , E = 20 μm .

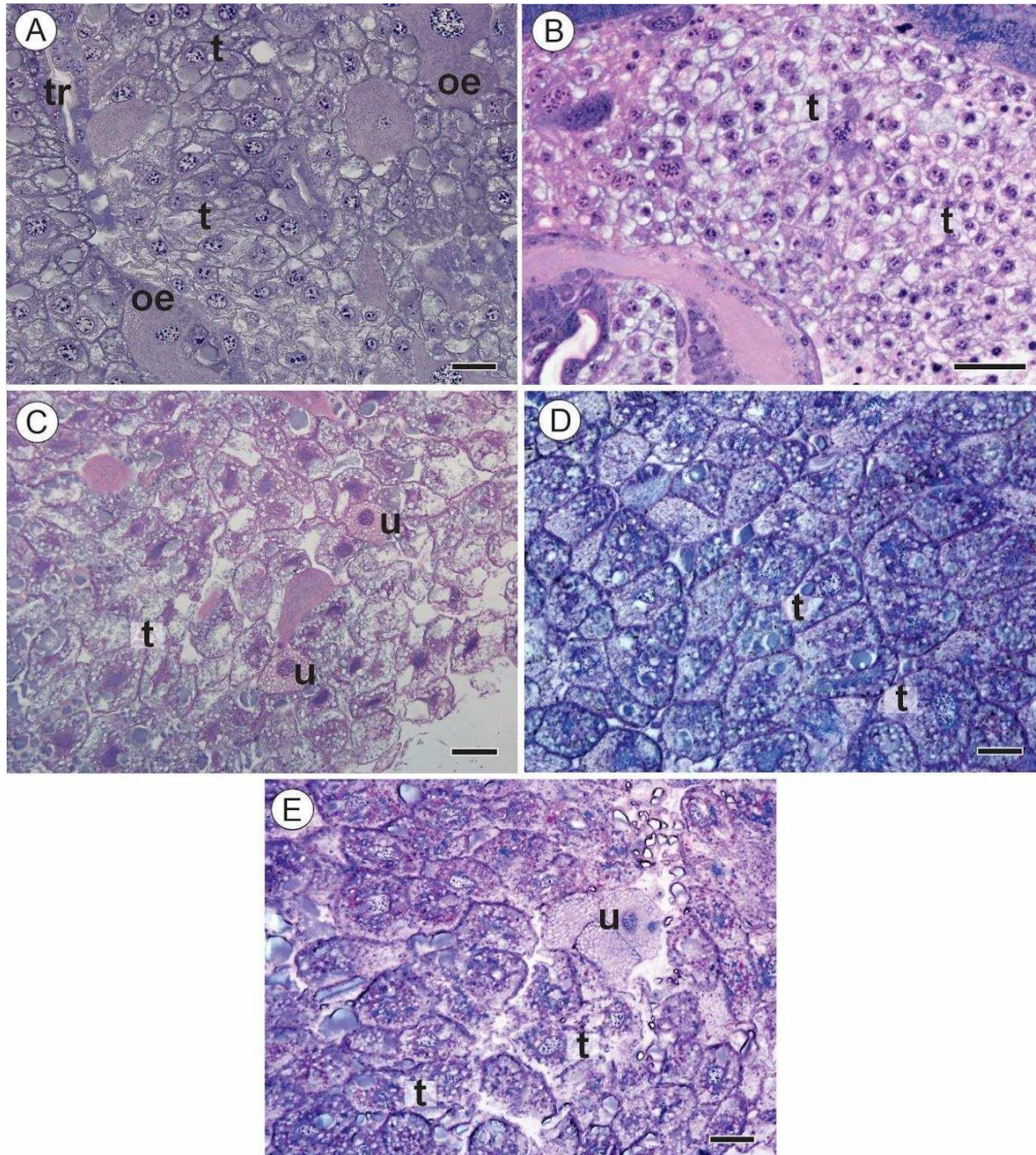


Figura 4: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* coradas com hematoxilina e eosina em diferentes fases do desenvolvimento mostrando trofócitos (t), enócitos (oe) e urúcytos (u). tr = traqueia. A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala = 50 μm .

Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas controle de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento, mostrando enócitos (oe), trofócitos (t), traqueia (tr) e urócitos (u). A) 12 h; B) 48 h; E) 96 h. Barras de escala = 50 μm .

As larvas alimentadas com ciantraniliprole na dieta apresentaram trofócitos com picnose nuclear, caracterizado pelo núcleo pequeno e com cromatina fortemente condensada, até 72 horas (Fig. 5A-D; Apêndice 3). Nenhuma alteração morfológica foi encontrada nos enócitos (Fig. 5A, 5D) e urócitos (Fig. 5C).

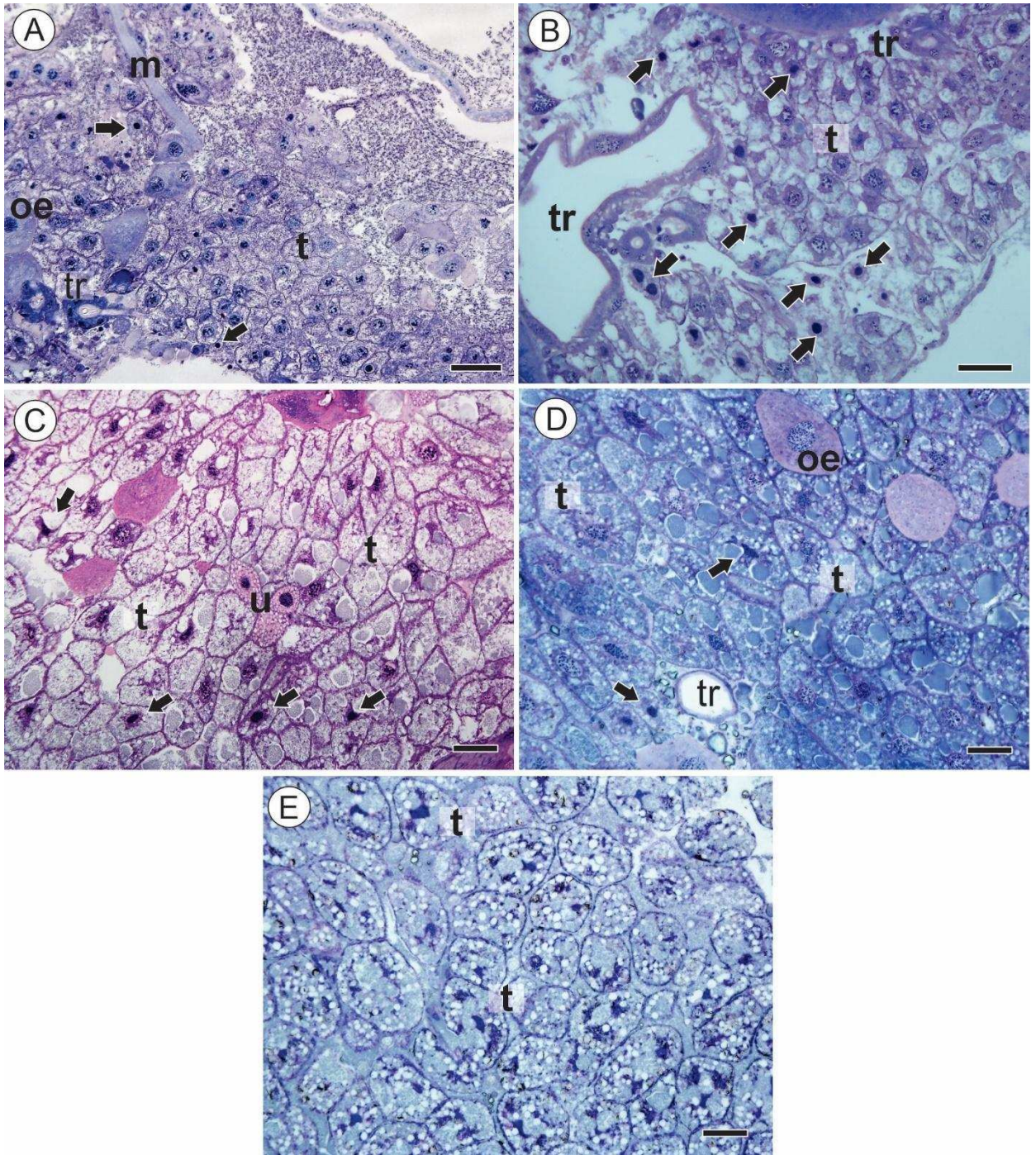


Figura 5: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento exposta ao inseticida ciantraniliprole. A) presença de trofócitos (t), trofócito em picnose (seta preta) e enócitos (oe). B) aumento no número de trofócitos em picnose (setas pretas). C) presença de uróctios (u) entre os trofócitos (t). D) trofócitos (t) e enócitos (oe). E) trofócitos (t). m: músculo; tr: traqueia. A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h de exposição ao inseticida ciantraniliprole. Barras de escala = 50 μ m.

4.3 Histoquímica

O teste histoquímico para detecção de proteínas teve forte reação positiva no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* ao longo do desenvolvimento larval e reação mais fraca na borda estriada do grupo controle (Fig. 6A-E). Entretanto, o epitélio intestinal das larvas tratadas com ciantraniliprole apresentou reação irregular para proteínas ao longo do desenvolvimento evidenciando alterações na forma celular (Fig. 7A-E), presença de vacúolos (Fig. 7A), protusões apicais (Fig. 7A-B) e borda estriada (Fig. 7A-E) com fraca reação para proteínas.

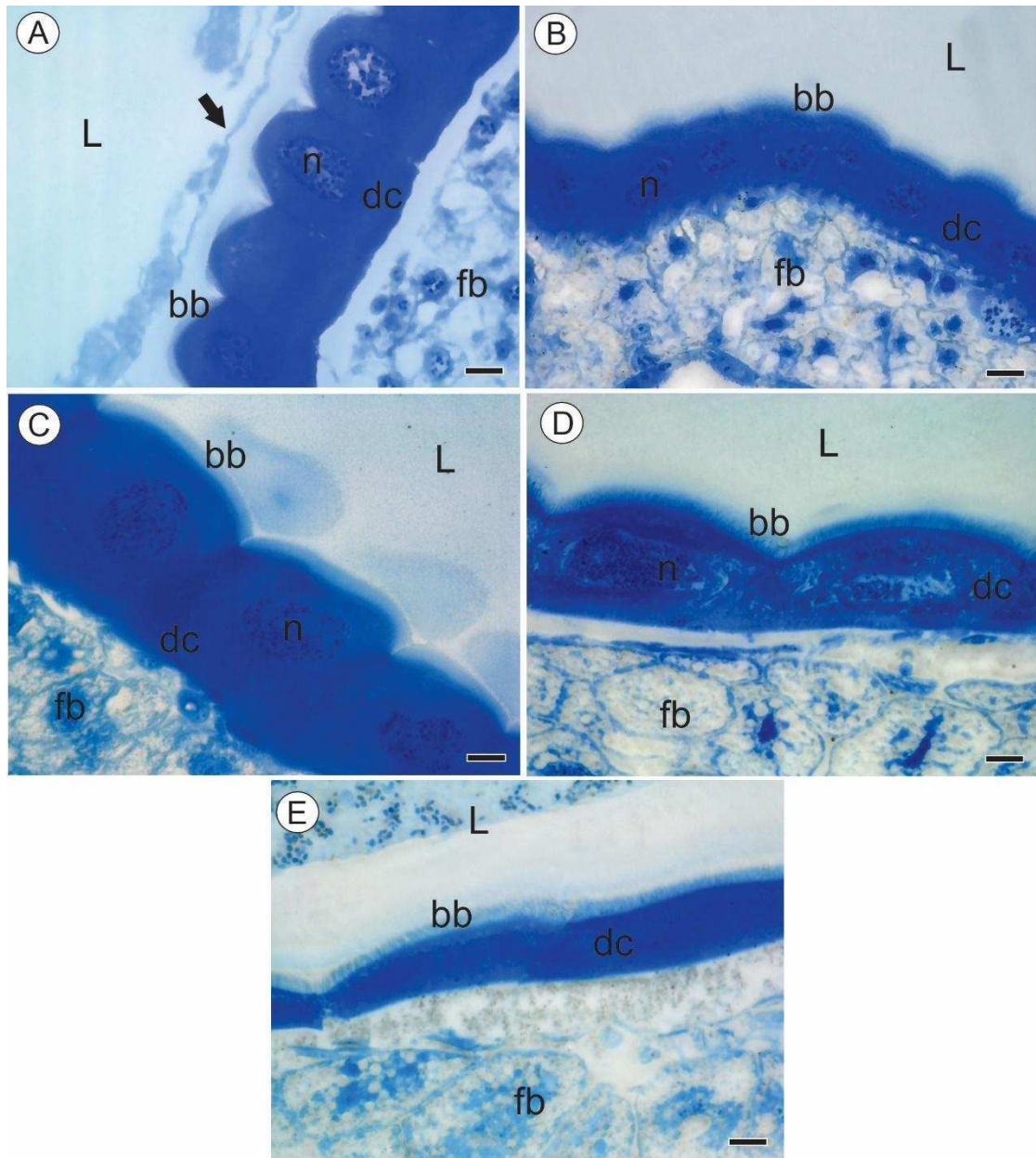


Figura 6: Micrografias de luz do epitélio intestinal de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento corados com azul de bromofenol demonstrando células digestivas (dc), núcleo com cromatina descondensada (n), borda estriada (bb) e matriz peritrófica (seta preta). fb: corpo gorduroso; L: lúmen. A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala = 20 μ m.

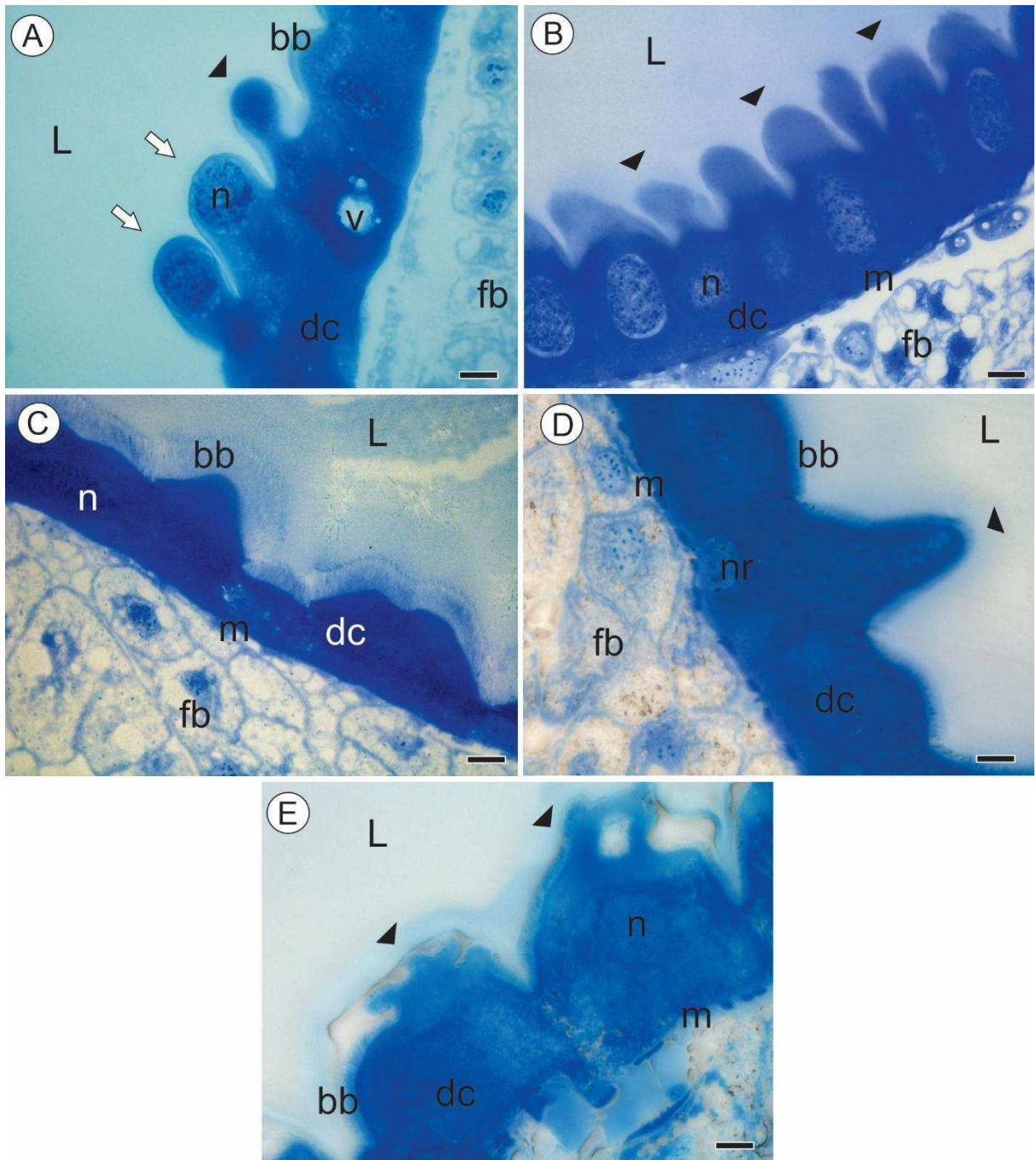


Figura 7: Micrografias de luz do epitélio intestinal de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento corados com azul de bromofenol. A) presença de protrusão citoplasmática (ponta de seta), vacúolo (v) e perda de contato celular com o epitélio (seta branca); B) aumento no número de protusões citoplasmáticas (ponta de seta); D-E) presença de protusões (ponta de seta). n = núcleo, dc = célula digestiva, L= lúmen, fb = corpo gorduroso, nr = ninhos de células regenerativas, m = músculo, bb= borda estriada. A) 12 h; B) 24 h; C) 48; D) 72 h; E) 96 h de exposição ao inseticida ciantraniliprole. Barras de escala = 20 μm .

A intensidade da reação de mercúrio de bromofenol no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* através da análise da intensidade de pixel não apresentou diferença entre o controle e o tratamento ($p > 0,05$, Fig. 8, Apêndice 1).

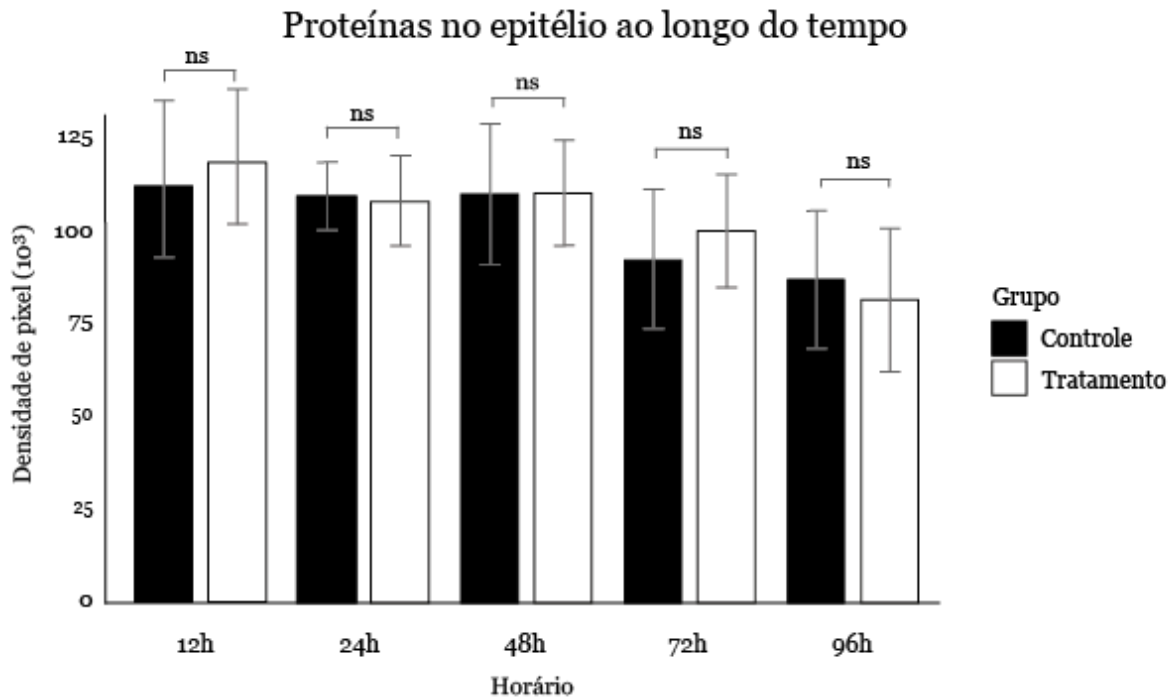


Figura 8: Densidade de pixels (média \pm SD) para proteínas no intestino médio de larvas de *Apis mellifera* do grupo controle e tratamento com ciantraniliprole em 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. ns: não significativo pelos testes t-Student e Mann -Whitney ($p > 0,05$).

O corpo gorduroso das larvas controle (Fig. 9A-E) e do tratamento (Fig. 10A-E) apresentaram reação positiva para proteínas distribuídas irregularmente pelo citoplasma, ocorrendo principalmente na região perinuclear. Da mesma forma, a intensidade da reação no corpo gorduroso foi semelhante entre controle e tratamento ($p > 0,05$, Fig. 11, Apêndice 1).

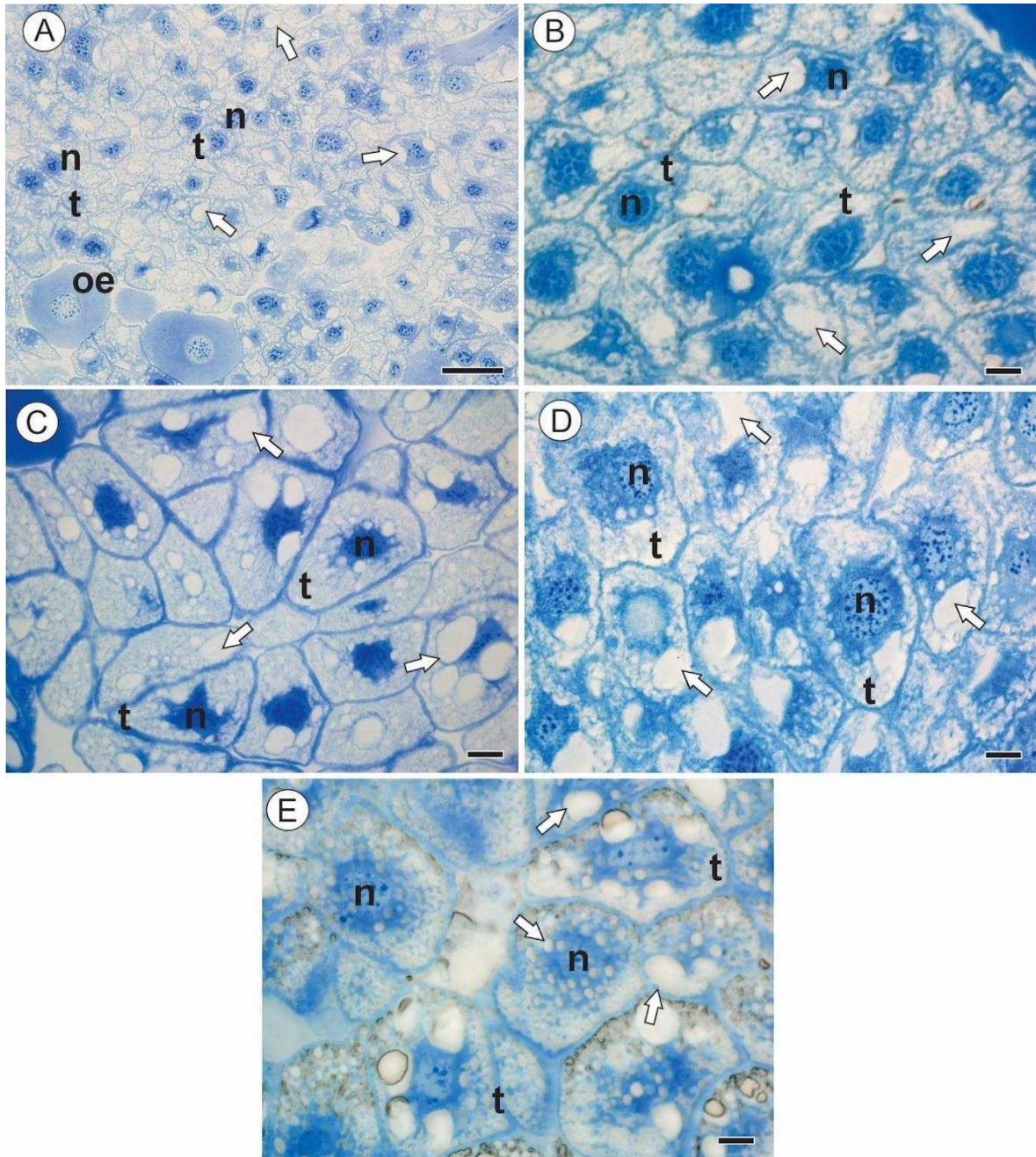


Figura 9: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento corados com azul de bromofenol demonstrando trofócitos (t), núcleos (n) com nucléolos evidentes, presença de gotículas lipídicas (seta branca) e enócito (oe). A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala A= 50 μm , B-C = 20 μm

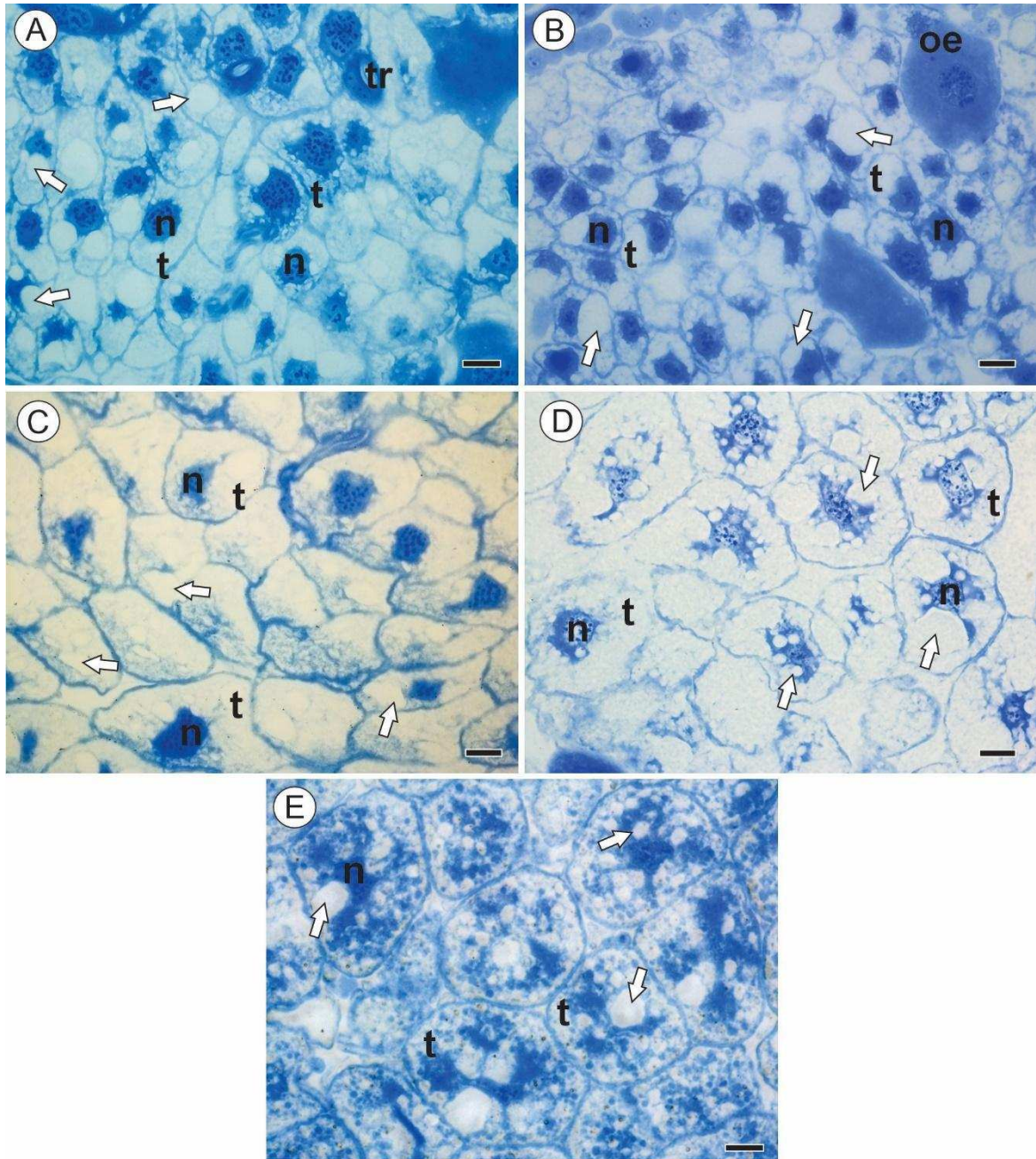


Figura 10: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* em diferentes fases do desenvolvimento corados com azul de bromofenol demonstrando trofócitos (t), núcleos (n) com nucléolos evidentes, presença de gotículas lipídicas (seta branca), enócito (oe) e traqueia (tr). A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h de exposição ao inseticida ciantraniliprole. Barras de escala = 20 μ m.

Proteínas no corpo gorduroso ao longo do tempo

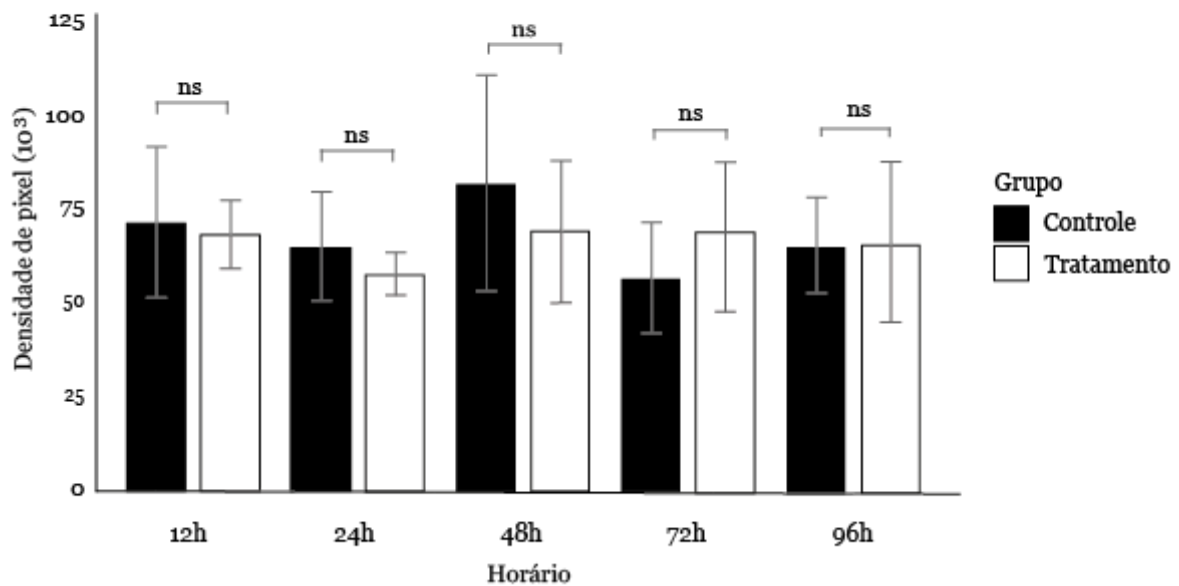


Figura 11: Densidade de pixels (média ± SD) para proteínas no corpo gorduroso de *Apis mellifera* do grupo controle e tratamento com ciantraniliprole em diferentes fases do desenvolvimento. ns: Não significativo pelos testes t-Student e Mann-Whitney ($p > 0,05$).

O teste histoquímico para detecção de carboidratos apresentou fraca reação positiva no citoplasma das células do epitélio do intestino médio e forte reação na borda estriada de *A. mellifera* do grupo controle com 12 e 24 horas (Fig. 12 A-B). A partir de 48 horas houve aumento na intensidade de reação no epitélio (Fig. 12 C-E).

Nas larvas expostas ao ciantraniliprole, o epitélio intestinal apresentou fraca reação até 48 horas (Fig. 13 A-B). A borda estriada apresentou forte reação ao PAS em 12 e 24 horas (Fig. 13A), mas a partir de 48 horas a reação foi fraca (Fig. 13 B-D). Com 72 e 96 horas de exposição há reações positivas escassas no citoplasma das células digestivas, nas protusões apicais e nos fragmentos celulares (Fig. 13 C-D).

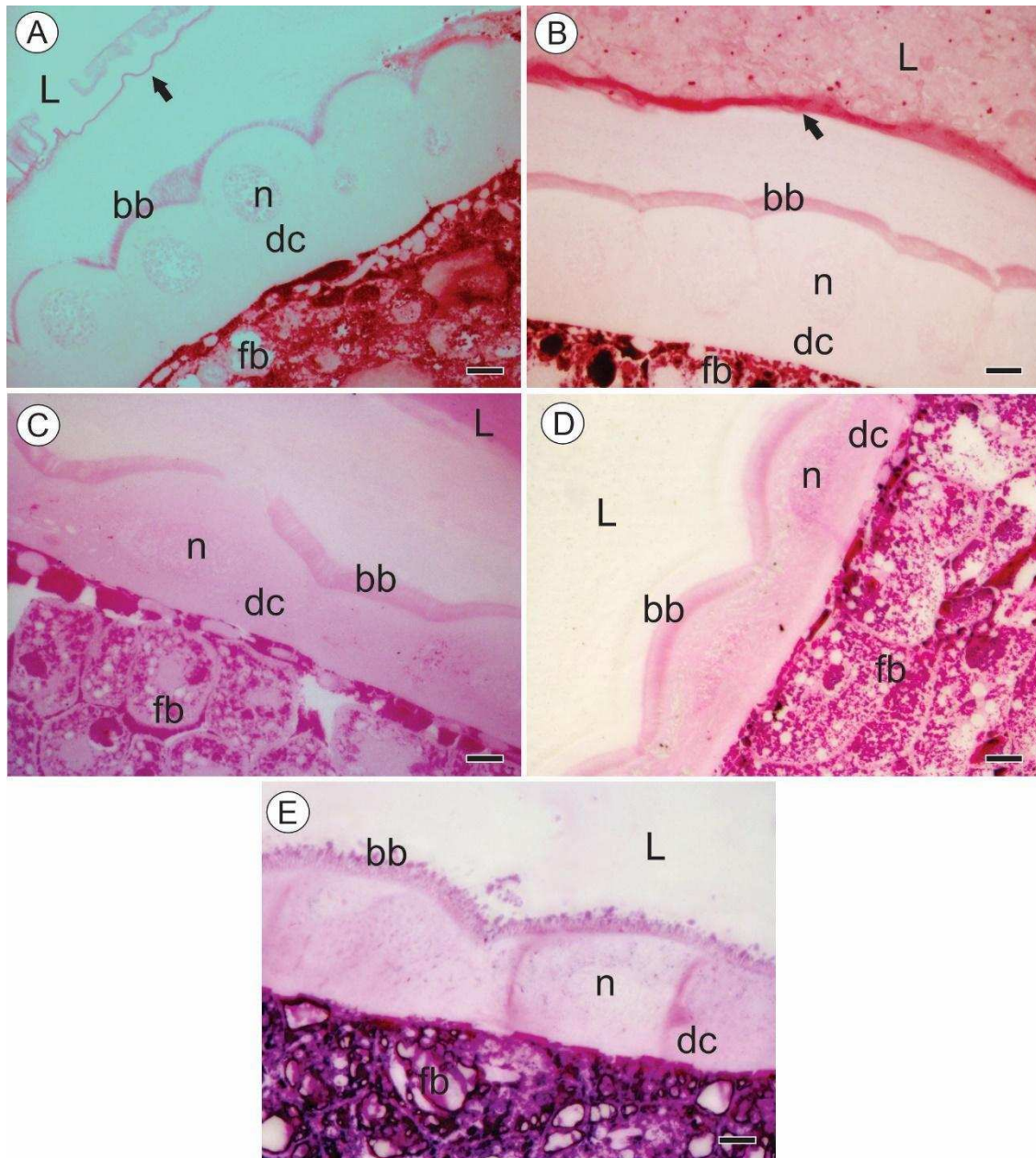


Figura 12: Micrografias de luz do epitélio intestinal de larva de *Apis mellifera* corados com ácido periódico de Schiff demonstrando células digestivas (dc), núcleo com cromatina descondensada (n), borda estriada (bb) com uma marcação um pouco mais intensa e matriz peritrófica (seta preta). fb: corpo gorduroso; L: lúmen. A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala = 20 μm .

Figura 12: Micrografias de luz do epitélio do intestino médio de larva controle de *Apis mellifera* submetidas ao teste de PAS mostrando células digestivas (dc) com reação fraca,

borda estriada (bb) e matriz peritrófica (setas) com reação forte. fb = corpo gorduroso, L= lúmen, n - núcleo. A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 96 h. Barras de escala = 20 μ m.

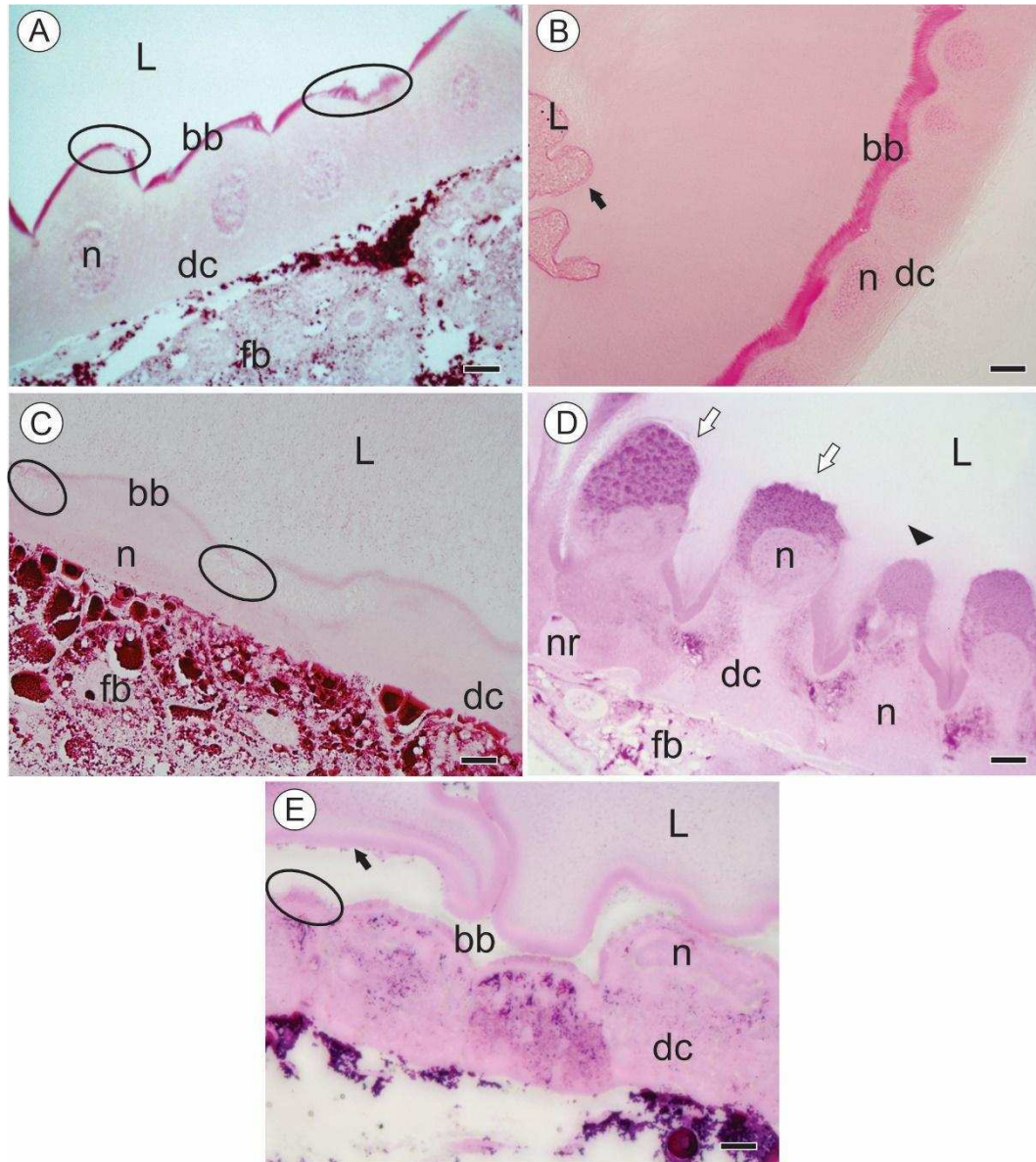


Figura 13: Micrografias de luz do epitélio intestinal de larva de *Apis mellifera* corados com ácido periódico de Schiff. A-B) fraca reação nas células digestivas (dc) e forte reação na borda estriada (bb). C) Fraca reação nas células digestivas (dc), desorganização (círculo) e fraca reação na borda estriada (bb). D) presença de pontos com forte marcação nas células digestivas (dc), na protusão citoplasmática (ponta de seta) e perda de contato celular (seta branca). E) forte marcação nas células digestivas (dc), desorganização (círculo) e fraca reação

na borda estriada. n = núcleo, seta preta = matriz peritrófica, fb = corpo gorduroso, L = lúmen. A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h de exposição ao inseticida ciantraniliprole. Barras de escala = 20 μm .

A intensidade da reação de PAS para polissacarídeos neutros no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* foi similar entre o controle e o tratamento com ciantraniliprole ($p > 0,05$, Fig. 14, Apêndice 12).

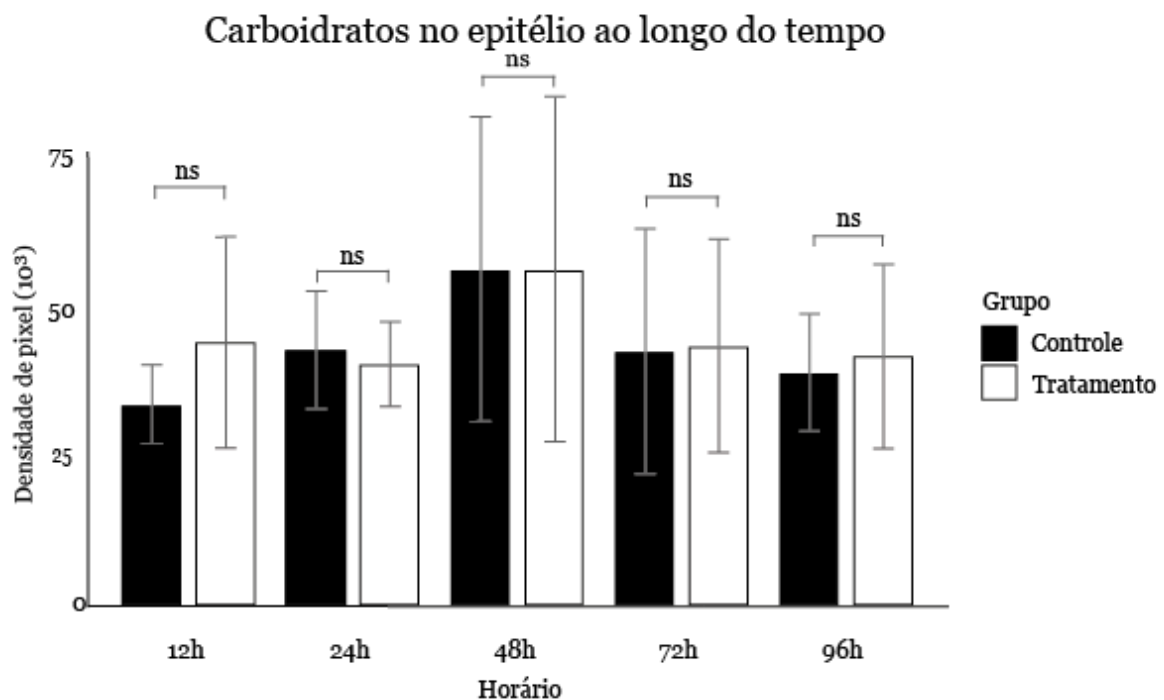


Figura 14: Densidade de pixels (média \pm SD) para polissacarídeos neutros no intestino médio de *Apis mellifera* do grupo controle e tratamento com ciantraniliprole em 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. ns: não significativo pelos testes t-Student e Mann -Whitney ($p > 0,05$).

O corpo gorduroso das larvas controle apresentou reação positiva para polissacarídeos neutros por todo o citoplasma dos trofócitos (Fig. 15A-E), enquanto naquelas expostas ao ciantraniliprole a reação foi aparentemente mais forte no citoplasma dos trofócitos (Fig. 16A-E).

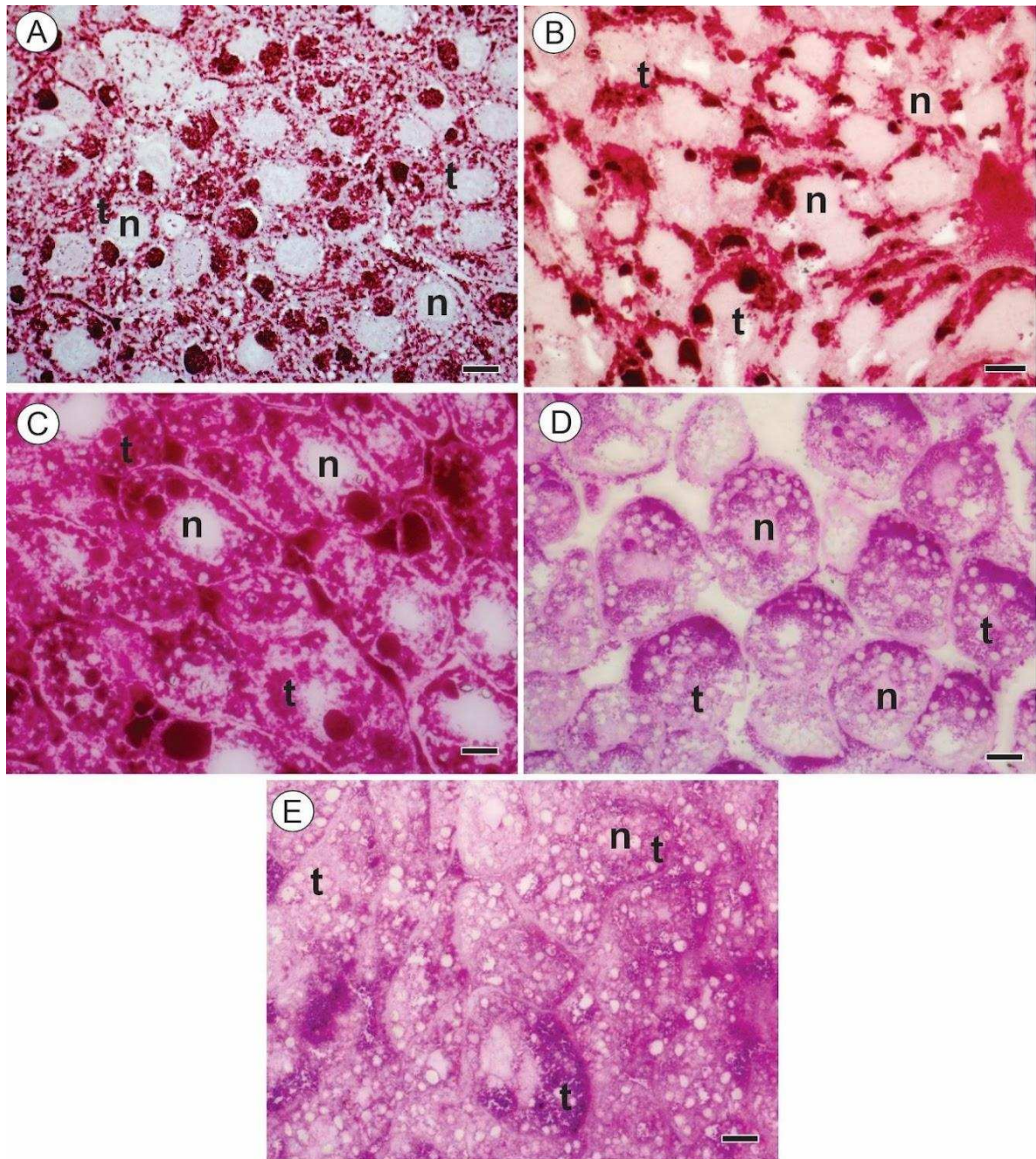


Figura 15: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larva de *Apis mellifera* corados com ácido periódico de Schiff demonstrando enócito (oe), núcleos (n) e trofócitos (t). A) controle com 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h. Barras de escala = 20 μ m

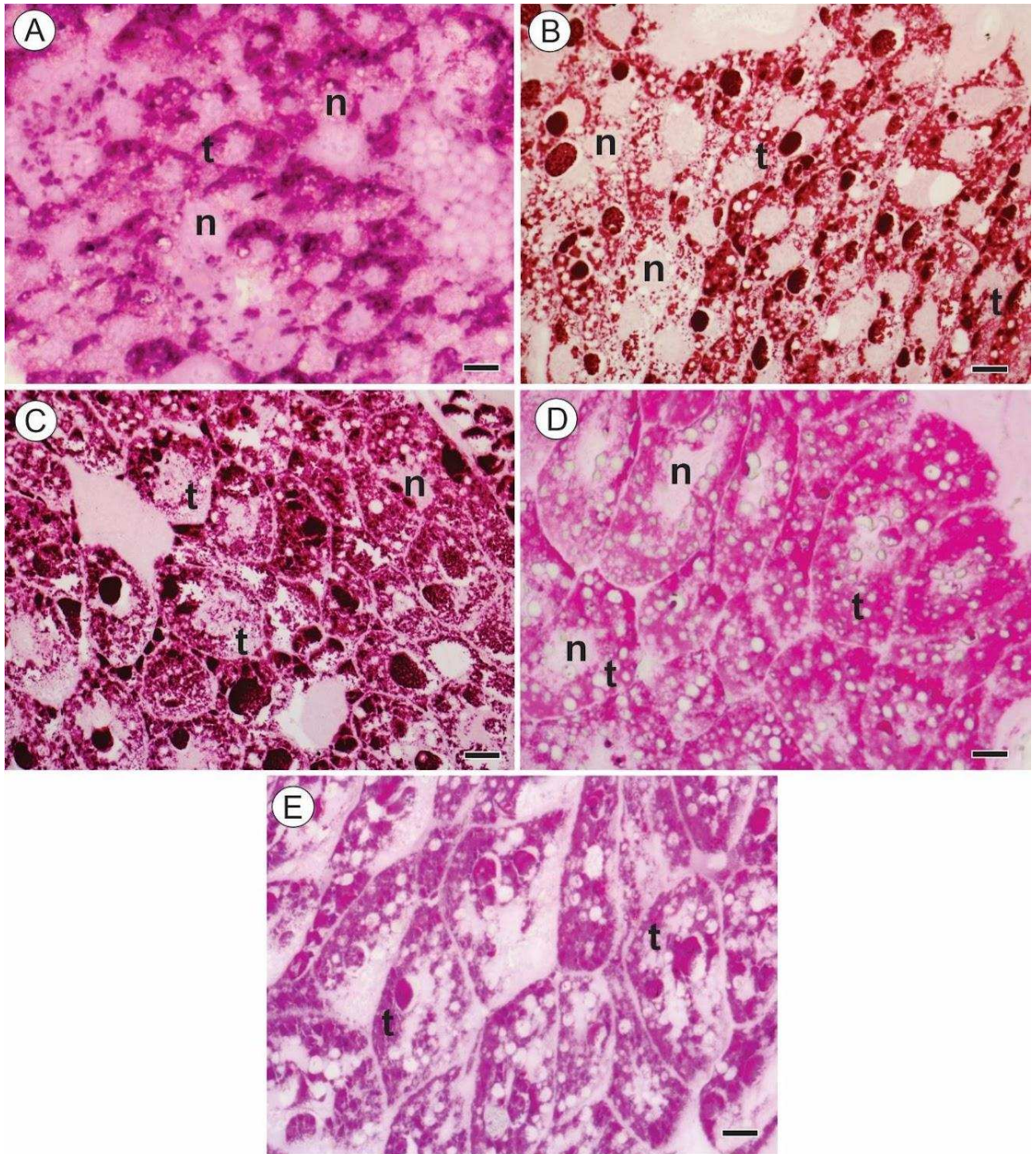


Figura 16: Micrografias de luz do corpo gorduroso de larva de *Apis mellifera* corados com ácido periódico de Schiff demonstrando, enócito (oe), núcleos (n) com nucléolos evidentes e trofócitos (t). A) 12 h; B) 24 h; C) 48 h; D) 72 h; E) 96 h de exposição ao inseticida ciantraniliprole. Barras de escala = 20 μm .

A intensidade da marcação do PAS no corpo gorduroso através da análise de pixels mostrou maior quantidade de polissacarídeos nos trofócitos de larvas tratadas com o inseticida por 72 horas que no controle ($W= 1$; $p = 0.015$), sendo semelhantes nos demais tempos de exposição ($p > 0,05$, Fig. 17, Apêndice 1).

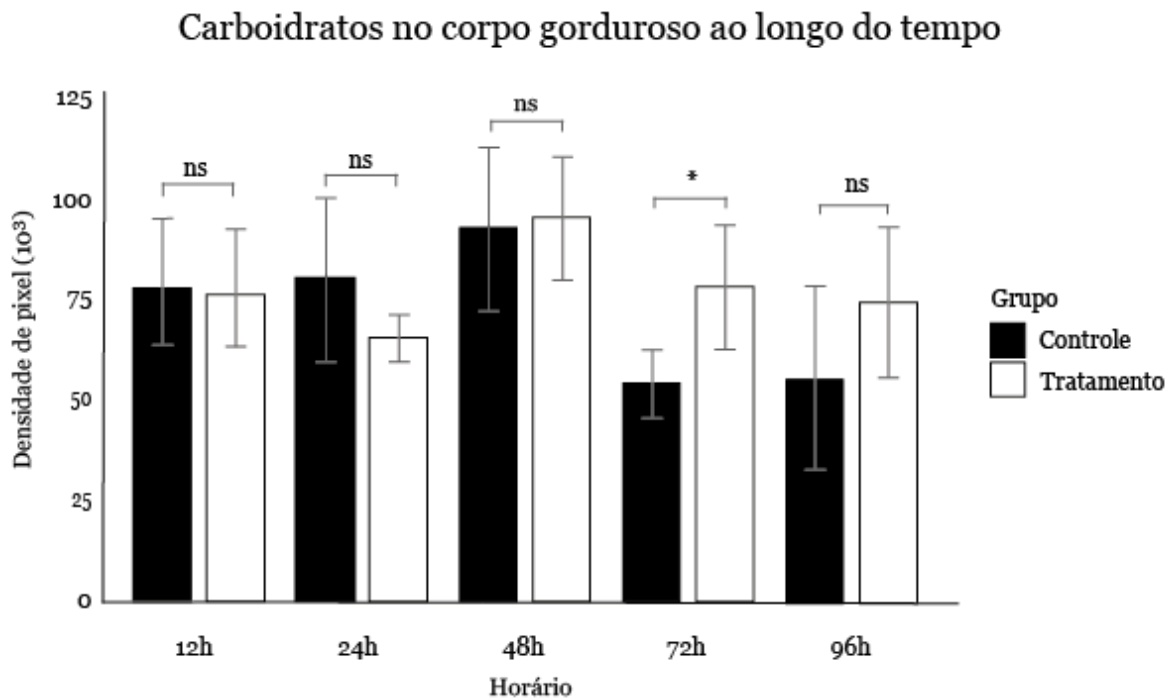


Figura 17: Densidade de pixels (média \pm SD) para polissacarídeos neutros no corpo gorduroso de *Apis mellifera* do grupo controle e tratamento com ciantraniliprole em diferentes fases do desenvolvimento. Asterisco – diferente pelo teste de Mann-Whitney ($p = 0,01$). ns – não significativo pelos t-Student e Mann – Whitney ($p > 0,05$).

4.4 Estresse oxidativo

As análises de estresse oxidativo, revelaram que a atividade enzimática da catalase, da superóxido dismutase, a peroxidação lipídica e a concentração de óxido nítrico foram semelhantes entre as larvas controle e expostas ao inseticida ciantraniliprole ($p > 0,05$; Fig. 18A-D, Apêndices 1-2). Entretanto, concentração de proteínas carboniladas ($U = 37.0$; $p = 0.001$) e a capacidade antioxidante total ($U = 73$; $p = 0.003$) foram maiores nas larvas

expostas ao ciantraniliprole por 96h e similares nos demais tempos de exposição (Fig. 18E-F, Apêndice 3).

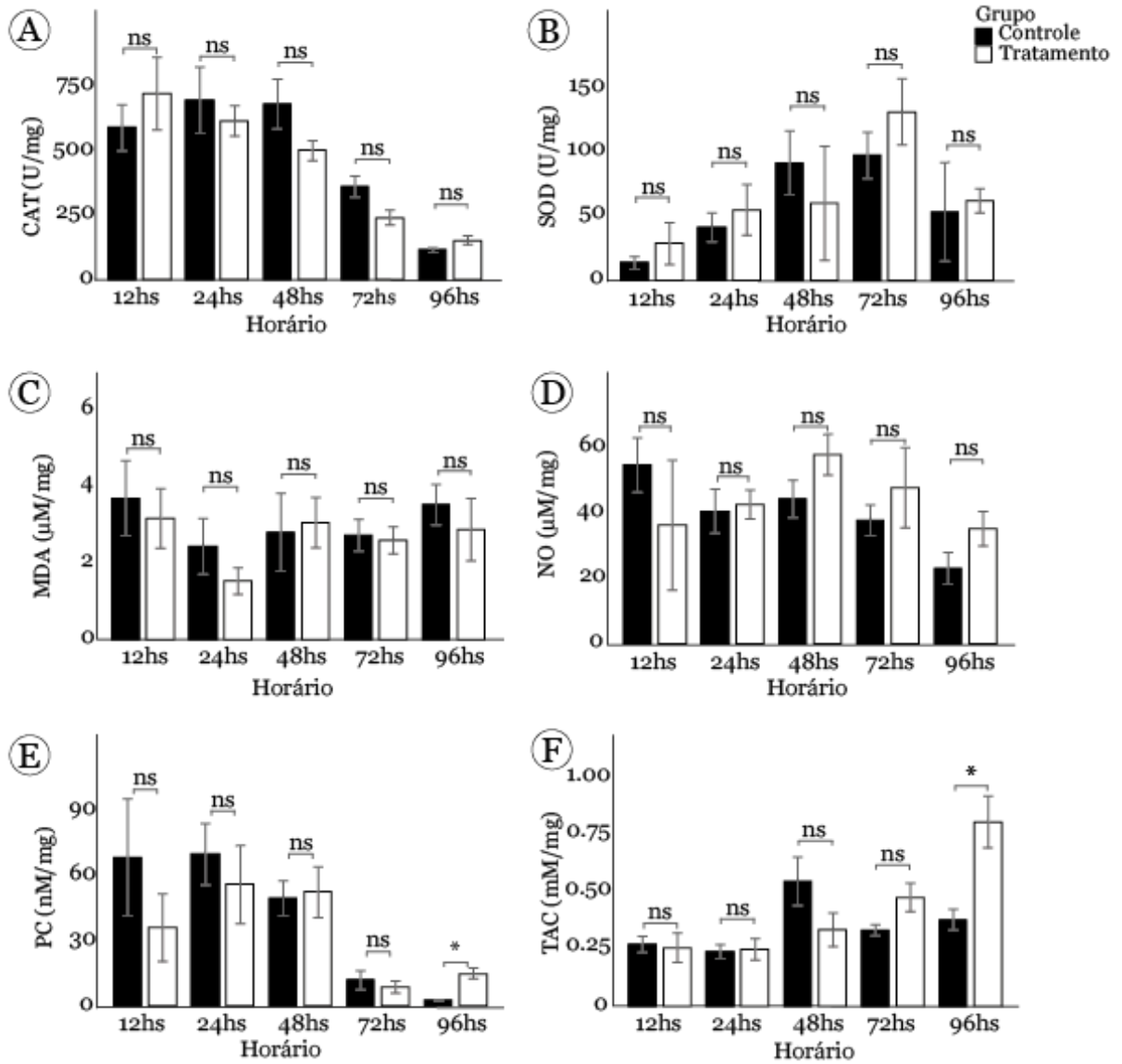


Figura 18: Atividade da enzima catalase (A), superóxido dismutase (B), peroxidação lipídica (C), óxido nítrico (D), proteína carbonilada (E) e capacidade antioxidante total (F) em larvas de *A. mellifera* do controle e expostas ao inseticida ciantraniliprole. * = diferença significativa e ns: não significativo pelos testes t e Mann-Whitney ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

As larvas de *A. mellifera* alimentadas durante seu desenvolvimento com a concentração residual de ciantraniliprole encontrada nos grãos de pólen não apresentam diferença no peso em comparação com aquelas controle, similar ao reportado para o inseticida dimetoato (López et al., 2017), mas diferente do relatado para larvas desta abelha alimentadas com dieta contendo glifosato (Dai et al., 2018) e o imidacloprido (Cook, 2019) e para o bicho da seda *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) exposto ao tiametoxam (Chen et al., 2023) que apresentaram redução de peso, bem como para o piriproxifeno que aumentou o peso das larvas de *B. mori* (Xu et al., 2022). Estes resultados indicam que como os pesticidas afetam os insetos varia conforme o grupo químico, sua concentração e da espécie exposta.

Embora as larvas de *A. mellifera* expostas ao ciantraniliprole não tenham apresentado alterações no peso do último instar de desenvolvimento, foram observadas alterações histopatológicas no intestino médio ao longo do desenvolvimento pós-embrionário e nos primeiros estágios no corpo gorduroso.

No intestino médio as principais alterações foram a desorganização da borda estriada, vacuolização citoplasmática, formação de protusões apicais, liberação de fragmento celular, secreção apócrina e picnose em ninhos de célula regenerativa, indicando que a concentração residual de ciantraniliprole é tóxica para as larvas de *A. mellifera*. Danos similares foram descritos em larvas de *A. mellifera* expostas à concentração do inseticida imidacloprido encontrada em grãos de pólen (Carneiro et al., 2023), assim como operárias adultas expostas aos inseticidas espiromesifeno (Serra et al., 2021) e imidacloprido (Carneiro et al., 2022), aos fungicidas iprodione (Carneiro et al., 2020) e azoxistrobina (Serra et al., 2023) e ao acaricida cyflumetofen (Reis et al., 2024a; 2024b). Além de *A. mellifera*, danos similares foram reportados no intestino médio da abelha sem ferrão *Partamona helleri*

(Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae) exposta ao herbicida tebutiuron (Farder-Gomes, et al., 2024) e ao inseticida tiametoxam (de Oliveira Motta et al., 2024), e a lagarta *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) expostas a azamax (Farder-Gomes et al., 2022) e ao inseticida flupiradifurona (Lima, et al., 2024). A presença dos mesmos danos em diferentes organismos, expostos a variadas concentrações de diversos xenobióticos químicos, indica que essa é uma resposta fisiológica comum nos insetos.

Alterações na borda estriada do epitélio do intestino médio, no início do desenvolvimento larval com 12h e 24h de exposição ao ciantraniliprole, podem comprometer a absorção de nutrientes, uma vez que essas estruturas aumentam a superfície de absorção das células digestivas (Crawley et al., 2014) podendo chegar a 200x em algumas abelhas (Serrão e Cruz-Landim, 1995). Protusões citoplasmáticas apicais são comuns no intestino médio de abelhas, principalmente na porção posterior (Cruz Landim et al., 1996), porém, em excesso e, com a presença de vacúolos, podem ser um indicativo de processos de detoxificação para reduzir os efeitos do inseticida, liberando para o lúmen o composto tóxico ou componentes que precisam ser reciclados (Castro et al., 2021). A progressão das alterações morfológicas, desde a formação de protusões citoplasmáticas, aparecimento de vacuolização e liberação de fragmento celular também são danos indicativos de apoptose (Häcker, 2000). A liberação de fragmentos celulares com 48h e 72h de desenvolvimento larval causada pelo inseticida pode ser considerada uma resposta ao acúmulo de danos irreversíveis, ou que seja energeticamente alto para a célula reparar (Alberts et al., 2017). Porém, a liberação de secreção apócrina em larvas com 72h de exposição ao ciantraniliprole pode indicar que vias de detoxificação ainda poderiam estar ativas (Martínez et al., 2018), o que seria importante uma vez que também há danos nos ninhos de células regenerativas, e essas são as células responsáveis por repor as células digestivas perdidas (Fernandes et al., 2010, Dias et al., 2024).

Há de se considerar que nesse período a larva está encaminhando para os estágios finais do desenvolvimento pós-embrionário e ainda precisa absorver nutrientes suficientes para a metamorfose que envolve a reconstrução de diversos órgãos (Dobrovsky, 1951). Portanto, é plausível sugerir que esse processo de detoxificação contribui para manter a funcionalidade do epitélio, o que foi suportado pelos testes histoquímicos para detecção de proteínas e polissacarídeos que foram semelhantes entre as larvas tratadas e controle.

Os danos histopatológicos observados no epitélio do intestino médio das larvas de *A. mellifera* expostas ao ciantraniliprole, pode ser devido ao modo de ação deste inseticida, que atua nos receptores de rianodina (RyR), liberando íons cálcio do retículo sarcoplasmático das células musculares (Cordova et al., 2006; El-Sheikh e Ashour, 2022). Apesar de muito se mencionar sobre os receptores de RyR e sua ação no retículo sarcoplasmático de células musculares, esses receptores também estão presentes no retículo endoplasmático liso de outras células (Sattelle et al., 2008), incluindo o epitélio intestinal (Xie et al., 2012; Wan et al., 2014). Assim, uma vez que o mecanismo de ação do inseticida é a interação com RyR causando liberação de íons Ca^{2+} , ele pode levar a alterações na homeostase do Ca^{2+} intracelular, um importante sinalizador celular (Toprak et al., 2021), e afetar as células do epitélio intestinal.

A presença de picnose nuclear, foi a principal alteração nos trofócitos do corpo gorduroso, principalmente em 24 horas de exposição ao ciantraniliprole, indicando que o composto químico atravessa a barreira epitelial do canal alimentar. As alterações morfológicas no núcleo e intensa condensação da cromatina são características de apoptose (Burgoyne, 1999; Doonan e Cotter, 2008), um processo de morte celular regulado pela ativação de caspases (Nagata, 2018). A morte celular relacionada a via apoptótica no corpo gorduroso também foi relatado para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera: Apidae) exposta a concentrações subletais de imidacloprido,

piraclostrobina e glifosato (Farder-Gomes et al., 2024). Esses resultados indicam que, mesmo em concentrações residuais e subletais, os pesticidas são capazes de afetar o corpo gorduroso, um órgão não alvo desses compostos químicos.

Não foram observadas alterações morfológicas nos enócitos e urócitos nas larvas expostas ao ciantraniliprole. Enócitos são células de origem ectodérmica que podem estar distribuídos entre os trofócitos ou agrupados próximo à cutícula, responsáveis pela produção dos hidrocarbonetos que compõem a epicutícula do inseto, lipídeos e proteínas (Arrese e Soulages, 2010). A exposição a inseticidas em alguns casos pode levar a alterações morfológicas nos enócitos, como o aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, núcleos periféricos ou vacuolizados e alteração no tamanho e no contorno celular, conforme descrito para *A. mellifera* expostas a tiametoxam (Domingues, et al., 2017) e a abelha solitária *Tetrapedia diversipes* Klug, 1810 (Hymenoptera: Apidae) exposta a imidacloprido (de Assis, et al., 2022). Entretanto, o ciantraniliprole na concentração residual encontrada nos grãos de pólen não causa danos nestas células, similar ao reportado para o imidacloprido em *A. mellifera* (Carneiro et al., 2023) e em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (Marriel et al., 2016). Em todo caso, a presença, ou ausência, de alterações morfológicas nessa célula pode estar relacionada com o modo de ação do inseticida, o tempo de exposição e a concentração usada.

Urócitos são trofócitos modificados presentes no último estágio de desenvolvimento larval que acumulam urato e resíduos nitrogenados, compondo o sistema excretório das larvas durante a fase de substituição dos túbulos de Malpighi larvais pelos do adulto (Cruz Landim, 2009; Furtado et al., 2013; Skowronek et al., 2021). Apesar de ter ocorrido liberação de fragmentos celulares para o lúmen do intestino médio, presença de picnose nuclear em alguns trofócitos e oxidação proteica, os dois primeiros danos ocorreram em até 72 horas de exposição ao inseticida e a oxidação proteica foi significativa apenas em 96 horas, fase do

desenvolvimento em que os urócitos começam a ser frequentes por estar próximo ao final do estágio larval. A degradação desses compostos antes do aparecimento dos urócitos pode ter sido metabolizada por outras vias, evitando alterações morfológicas pelo acúmulo de resíduos nitrogenados provenientes dos ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, o ciantraniliprole foi administrado em uma concentração residual e durante o período de exposição mecanismos de defesa foram ativados para neutralizar o inseticida, conforme apontado pelos resultados da capacidade antioxidante total, o que poderia explicar a ausência de alterações nos urócitos que não são células alvo do inseticida.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa no corpo gorduroso para a presença de proteínas, as larvas no grupo tratado com 72 horas de exposição ao inseticida apresentaram maior reserva de polissacarídeos que aquelas do controle. No estágio larval, o corpo gorduroso tem como função principal o acúmulo de reservas energéticas, sendo os lipídeos a primeira fonte energética a ser armazenada e os carboidratos a segunda sob a forma de glicogênio (Cruz Landim, 2009). Parte dessas reservas são mobilizadas a cada muda larval e para atender as necessidades do organismo (Arrese e Soulages, 2010). O período em que ocorreu intensa marcação no grupo tratado corresponde ao momento em que havia alta liberação celular para o lúmen, além de estar próximo ao final do estágio larval. Dessa forma, o acúmulo de glicogênio pode ser uma resposta de sobrevivência para se proteger de condições adversas e ter energia suficiente para a reconstrução dos tecidos durante o período de pupação. O acúmulo de glicogênio nos trofócitos já foi relatado para o besouro *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) resistentes a inseticida, em comparação com os besouros suscetíveis (Guedes et al., 2006), como uma forma de mobilização de energia para a formação de mecanismos de resistência.

As análises de estresse oxidativo revelam um aumento na capacidade antioxidante total e de proteínas carboniladas nas larvas expostas ao ciantraniliprole no final do

desenvolvimento, mas sem diferença significativa para catalase, superóxido dismutase, óxido nítrico e malondealdeído. A capacidade antioxidante total indica como o conjunto de substâncias antioxidantes reagem a determinadas situações no organismo e todas as larvas foram alimentadas com geleia real, uma substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das operárias que possui múltiplas propriedades funcionais, dentre elas a ação antioxidante (Martinello e Mutinelli, 2021). Como a única diferença na alimentação das larvas era a presença do inseticida, o aumento na capacidade antioxidante total das larvas expostas ao inseticida no final do desenvolvimento é um indicativo de que esse tipo de defesa protege parcialmente o organismo contra o ciantraniliprole em concentração residual, uma vez que não houve alteração nas enzimas e outros marcadores de estresse oxidativo, mas não ao ponto de evitar a oxidação de proteínas, uma modificação irreversível que pode levar à perda de função das proteínas afetadas (Akagawa, 2021).

5 CONCLUSÃO

A exposição a inseticidas durante a coleta de provisões, como o pólen, é comum para as abelhas, podendo levar a danos subletais, sendo que os impactos dessa interação com larvas de abelha passaram a ser um tópico de interesse nos últimos anos, contribuindo para um melhor entendimento de como esses compostos químicos podem afetar o comportamento, desenvolvimento e fisiologia desses organismos. Os resultados aqui obtidos evidenciam que danos histopatológicos no intestino médio, alteração na concentração de carboidratos no corpo gorduroso e aumento de marcadores de estresse oxidativo indicam efeitos colaterais do ciantraniliprole nas larvas em concentração campo-realista de resíduos do ciantraniliprole em grãos de pólen. Estudos futuros analisando se os efeitos da concentração residual consumidos durante o estágio larval impactam as operárias adultas podem contribuir com a avaliação de riscos deste inseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abati, R., Sampaio, A. R., Maciel, R. M. A., Colombo, F. C., Libardoni, G., Battisti, L., Potrich, M. (2021). Bees and pesticides: The research impact and scientometrics relations. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 32282-32298. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>
- Akagawa, M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, 55(4), 307-320. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Hunt, T. (2017). Morte celular. In: Alberts, Bruce et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora. Cap. 18, p. 1022.
- Almeida, E. A., Bossert, S., Danforth, B. N., Porto, D. S., Freitas, F. V., Davis, C. C., Pie, M. R. (2023). The evolutionary history of bees in time and space. *Current biology*, 33(16), 3409-3422. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.07.005>
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., Vanengelsdorp, D., Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48, 364-370. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0482-2>
- Araújo, M. F., Castanheira, E. M., Sousa, S. F. (2023). The buzz on insecticides: a review of uses, molecular structures, targets, adverse effects, and alternatives. *Molecules*, 28(8), 3641. <https://doi.org/10.3390/molecules28083641>
- Arrese, E. L., Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Bruckner, S., Wilson, M., Aurell, D., Rennich, K., Vanengelsdorp, D., Steinhauer, N., Williams, G. R. (2023). A national survey of managed honey bee colony losses in the

- USA: results from the Bee Informed Partnership for 2017–18, 2018–19, and 2019–20. *Journal of Apicultural Research*, 62(3), 429-443. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2264601>
- Aznar-Alemany, Ò., Eljarrat, E. (2020). Introduction to pyrethroid insecticides: chemical structures, properties, mode of action and use. *Pyrethroid Insecticides*, 1-16. https://doi.org/10.1007/698_2019_435
- Barry, J. D., Portillo, H. E., Annan, I. B., Cameron, R. A., Clagg, D. G., Dietrich, R. F., Kaczmarczyk, R. A. (2015). Movement of cyantraniliprole in plants after foliar applications and its impact on the control of sucking and chewing insects. *Pest Management Science*, 71: 395-403. <https://doi.org/10.1002/ps.3816>
- Basualdo, M., Cavigliasso, P., de Avila Jr, R. S., Aldea-Sánchez, P., Correa-Benítez, A., Harms, J. M. Salvarrey, S. (2022). Current status and economic value of insect-pollinated dependent crops in Latin America. *Ecological Economics*, 196, 107395. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107395>
- Bava, R., Castagna, F., Lupia, C., Poerio, G., Liguori, G., Lombardi, R Palma, E. (2024). Hive products: composition, pharmacological properties, and therapeutic applications. *Pharmaceuticals*, 17(5), 646. <https://doi.org/10.3390/ph17050646>
- Beekman, M., Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14(4), 490-496. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x>
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C.P.W, Rosenkranz, P., Wallner K. (2018). From field to food—will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly? *Apidologie* 49, 112–119. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0533-3>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bruckner, S., Wilson, M., Aurell, D., Rennich, K., Vanengelsdorp, D., Steinhauer, N., Williams, G. R. (2023). A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership for 2017–18, 2018–19, and 2019–20. *Journal of Apicultural Research*, 62(3), 429–443. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2158586>
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burgoyne, L. A. (1999). The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Experimental Cell Research*, 248(1), 214-222. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4406>
- Caccia, S., Casartelli, M., Tettamanti, G. (2019). The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research*, 377, 505-525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>
- Carneiro, L. S., Santos, C. G., de Resende, M. T. C. S., de Souza, D. L. L., dos Santos Souza, D., da Cruz Souza, A. M., Serrão, J. E. (2023). Effects of the insecticide imidacloprid on the post-embryonic development of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, 905, 167278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167278>
- Carneiro, L. S., Martinez, L. C., De Oliveira, A. H., Cossolin, J. F. S., De Resende, M. T. C. S., Gonçalves, W. G., Serrão, J. E. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces

- apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment*, 815, 152847. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>
- Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., Serrão, J. E. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 189, 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
- Castilhos, D., Bergamo, G.C., Gramacho, K.P., Gonçalves, L.S. 2019. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie* 50, 263–272. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>
- Castro, B. M. D. C., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., Wilcken, C. F., Zanuncio, A. J. V., Serrão, J. E. (2021). Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere*, 263, 128008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128008>.
- Chapman, R.F., (2013). *The Insects: Structure and Function*, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Chen, Q., Sun, S., Yang, X., Yan, H., Wang, K., Ba, X., Wang, H. (2023). Sublethal effects of neonicotinoid insecticides on the development, body weight and economic characteristics of silkworm. *Toxics*, 11(5), 402. <https://doi.org/10.3390/toxics11050402>
- Cook, S. C. (2019). Compound and dose-dependent effects of two neonicotinoid pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) metabolic physiology. *Insects*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.3390/insects10010018>
- Cordova, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J. S., Lahm, G. P., Tao, Y. (2006). Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action,

- ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(3), 196-214.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>
- Costa, E. M., de Barros, C. H. P., Silva, K. O., Mendonça, A. J. T., Cardoso, T. A. L., Bezerra, C. E. S., Araujo, E. L. (2024). Toxicity of anthranilamides used in cucurbit cultivation on *Apis mellifera*. *Comunicata Scientiae*, 15, 26. <https://doi.org/10.14295/CS.v15.4075>
- Couvillon, M. J., Schürch, R., Ratnieks, F. L. (2014). Waggle dance distances as integrative indicators of seasonal foraging challenges. *PloS One*, 9(4), e93495.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093495>
- Crawley, S. W., Mooseker, M. S., Tyska, M. J. (2014). Shaping the intestinal brush border. *Journal of Cell Biology*, 207(4), 441-451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407015>
- Cruz Landim, C. 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. Unesp.
- Cruz Landim, C., Serrão, J. E., Silva De Moraes, R. L. M. (1996). Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees.
- Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Diao, Q. (2018). The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7786-7793. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212>
- de Assis, J. C., da Costa Domingues, C. E., Tadei, R., da Silva, C. I., Lima, H. M. S., Decio, P., Silva-Zacarin, E. C. (2022). Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Environmental Pollution*, 304, 119140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119140>
- de Oliveira Motta, J. V., Gomes, D. S., da Silva, L. L., de Oliveira, M. S., Bastos, D. S. S., Resende, M. T. C. S., Serrão, J. E. (2024). Effects of sublethal concentration of thiamethoxam formulation on the wild stingless bee, *Partamona helleri* Friese

- (Hymenoptera: Apidae): Histopathology, oxidative stress and behavioral changes. *Science of The Total Environment*, 957, 177626. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177626>
- Derecka, K., Blythe, M. J., Malla, S., Genereux, D. P., Guffanti, A., Pavan, P., Stöger, R. (2013). Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PloS One*, 8(7), e68191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068191>
- Dias, W. C. S., Teixeira, É. W., Serrão, J. E. (2024). Regenerative Cells in the Midgut of the Honey Bee *Apis mellifera* (Apidae: Apini) Queens with Different Ages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24230473. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024230473>
- Dinter, A., Samel, A. (2015). 3.6 Cyantraniliprole: Low risk for bees resulting from seed treatment use in oilseed rape. Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, Ghent (Belgium), *Julius Kühn Archiv* 450, 169.
- Dinter, A., Samel, A. (2015). Cyantraniliprole: Pollinator profile of the novel insecticides under laboratory, semi-field and field conditions. Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, Ghent (Belgium), *Julius Kühn Archiv* 450, 28-49.
- Dobrovsky, T.M. (1951). Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honeybee. *Cornell University Agriculture Experimental Station Memories*, 301: 03-47.
- Domingues, C. E., Abdalla, F. C., Balsamo, P. J., Pereira, B. V., de Alencar Hausen, M., Costa, M. J., Silva-Zacarin, E. C. (2017). Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*, 186, 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>
- Doonan, F., Cotter, T. G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 44(3), 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.006>

- Dorneles, A.L., de Souza Rosa-Fontana, A., Dos Santos, C.F., Blochtein, B. (2021). Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. *Environmental Pollution*, 272, 116414. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116414>
- El-Sheikh, E.S.A., Ashour, M.B.A. (2022). Diamide insecticides: efficacy, toxicity and analytical methods for residue monitoring in food samples. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(5), 165-177. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.96445.4513>
- European Food Safety Authority. (2014). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyantraniliprole. *EFSA Journal*, 12(9), 3814. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3814>
- Farder-Gomes, C. F., Miranda, F. R., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Gomes, D. S., da Silva, F. P., Fernandes, K. M. (2024). Exposure to the herbicide tebuthiuron affects behavior, enzymatic activity, morphology and physiology of the midgut of the stingless bee *Partamona helleri*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 110, 104516. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104516>
- Farder-Gomes, C. F., Saravanan, M., Martinez, L. C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2022). Azadirachtin-based biopesticide affects the respiration and digestion in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 41(2), 466-475. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1892764>
- Farder-Gomes, C. F., Grella, T. C., Malaspina, O., Nocelli, R. F. C. (2024). Exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate harm the behavior and fat body cells of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Science of The Total Environment*, 907, 168072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168072>

- Feketéné Ferenczi, A., Szűcs, I., Bauerné Gáthy, A. (2023). Evaluation of the Pollination Ecosystem Service of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Based on a Beekeeping Model in Hungary. *Sustainability*, 15(13), 9906. <https://doi.org/10.3390/su15139906>
- Fernandes, K. M., Araújo, V. A., Serrão, J. E., Martins, G. F., Campos, L. A., Neves, C. A. (2010). Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 56(2), 489.
- Furtado, W. C., Azevedo, D. O., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2013). Histochemistry and ultrastructure of urocytes in the pupae of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). *Microscopy and Microanalysis*, 19(6), 1502-1510. <https://doi.org/10.1017/S1431927613013445>
- Gokhman, V.E. (2023). Chromosome study of the Hymenoptera: history, current state, perspectives. *Biological Bulletin Reviews*, 13, 247–257. <https://doi.org/10.1134/S2079086423030040>
- Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Santana, W. C., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2017). Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. *Developmental Biology*, 431(2), 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.020>
- Grüter, C., Hayes, L. (2022). Sociality is a key driver of foraging ranges in bees. *Current Biology*, 32(24), 5390-5397. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.10.064>
- Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E., Guedes, N. M. P., Ribeiro, B., Serrão, J. E. (2006). Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*, 31(1), 30-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00479.x>
- Guo, W., Kain, W., Wang, P. (2019). Effects of disruption of the peritrophic membrane on larval susceptibility to Bt toxin Cry1Ac in cabbage loopers. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103897. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103897>

- Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301, 5–17 (2000).
<https://doi.org/10.1007/s004410000193>
- Hadwan, M. H., Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, 6, 194-199.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
- Hegedus, D. D., Toprak, U., Erlandson, M. (2019). Peritrophic matrix formation. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103898. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103898>
- Huber, J.T. (2017). Biodiversity of Hymenoptera. In *Insect Biodiversity* (eds R.G. Foottit and P.H. Adler), pp. 419-461. <https://doi.org/10.1002/9781118945568.ch12>
- Ibrahim, E. D. S., Abd Alla, A. E., El-Masarawy, M. S., Salem, R. A., Hassan, N. N., Moustafa, M. A. (2023). Sulfoxaflor influences the biochemical and histological changes on honeybees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicology*, 32(5), 674-681.
<https://doi.org/10.1007/s10646-023-02677-0>
- Janzen, D. H. (1971). Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, 171(3967), 203-205. <https://10.1126/science.171.3967.203>
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64, 305-316.
<https://doi.org/10.1007/s00265-009-0874-7>
- Kadala, A., Charreton, M., Charnet, P., Collet, C. (2019). Honey bees long-lasting locomotor deficits after exposure to the diamide chlorantraniliprole are accompanied by brain and muscular calcium channels alterations. *Scientific Reports* 9, 2153.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39193-3>
- Kast, C., Kilchenmann, V. (2022). An *in vitro* model for assessing the toxicity of pesticides in beeswax on honey bee larvae. *Chemosphere*, 287, 132214.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132214>

- Ke, L., Chen, X., Dai, P., Liu, Y. J. (2023). Chronic larval exposure to thiacloprid impairs honeybee antennal selectivity, learning and memory performances. *Frontiers in Physiology*, 14, 1114488. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1114488>
- Khalifa, S. A., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- Kim, J., Chon, K., Kim, B. S., Oh, J. A., Yoon, C. Y., Park, H. H. (2022). Assessment of acute and chronic toxicity of cyantraniliprole and sulfoxaflor on honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Pest Management Science*, 78(12), 5402-5412. <https://doi.org/10.1002/ps.7162>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Klingelhöfer, D., Braun, M., Brüggmann, D., Groneberg, D. A. (2022). Neonicotinoids: A critical assessment of the global research landscape of the most extensively used insecticide. *Environmental Research*, 213, 113727. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113727>
- Li, S., Yu, X., Feng, Q. (2019). Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64(1), 315-333. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>
- Li, Z., Wang, Y., Qin, Q., Chen, L., Dang, X., Ma, Z., Zhou, Z. (2024). Imidacloprid disrupts larval molting regulation and nutrient energy metabolism, causing developmental delay in honey bee *Apis mellifera*. *Elife*, 12, RP88772. <https://doi.org/10.7554/eLife.88772.3>
- Lima, B. S. A., Martínez, L. C., Rocha, F. A. D., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., Motta, J. V. O., Serrão, J. E. (2024). Effects of the insecticide flupyradifurone on *Anticarsia*

- gemmatalis* caterpillar and its predator *Podisus nigrispinus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(31), 43927-43940. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34010-5>
- López, J. H., Krainer, S., Engert, A., Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K. (2017). Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Scientific Reports*, 7(1), 40853. <https://doi.org/10.1038/srep40853>
- Lu, Y., Gao, J., Wu, T., Han, B., Qian, B., Shi, M., Dai, P. (2023). Exposure of chlorothalonil and acetamiprid reduce the survival and cause multiple internal disturbances in *Apis mellifera* larvae reared *in vitro*. *Frontiers in Physiology*, 14, 1114403. <https://10.3389/fphys.2023.1114403>
- Mantzoukas, S., Kosmidou, G., Gekas, A., Kitsiou, F., Eliopoulos, P. A., Patakioutas, G. (2022). A preliminary analysis on the insecticidal effect of cyantraniliprole against stored-product pests. *Applied Sciences*, 12(3), 1297. <https://doi.org/10.3390/app12031297>
- Marklund, S., Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474.
- Martinello, M., Mutinelli, F. (2021). Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants*, 10(1), 71. <https://doi.org/10.3390/antiox10010071>
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., da Silva Neves, G., Gonçalves, W. G., Zanuncio, J. C., Bozdoğan, H., Serrão, J. E. (2018). Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere*, 212, 629-637. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.134>
- Michelette, E. R., Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 24(4), 431-440. <https://doi.org/10.1051/apido:19930410>

- Marques-Silva, S., Serrão, J. E., Mezêncio, J. M. S. (2005). Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. *Acta histochemica*, 107(1), 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.10.003>
- Marriel, N. B., Tomé, H. V. V., Guedes, R. C. N., Martins, G. F. (2016). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta Tropica*, 158, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.021>
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., VanEngelsdorp, D., Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS One*, 5(3), e9754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- Murawska, A., Migdał, P., Roman, A. (2021). Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. *Agriculture*, 11(7), 648. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070648>
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 489-517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
- Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J.; Zhu, C.D., Ascher, J.S. (2021). Global patterns and drivers of bee distribution. *Current Biology*, 31(3), 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.03.058>
- Pervez, M., Manzoor, F. (2022). Honey bee losses and pesticides threat: an Asian perspective. *Journal of Apicultural Research*, 62(1), 64–75. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2103331>
- Pes, M. P., Melo, A. A., Stacke, R. S., Zanella, R., Perini, C. R., Silva, F. M., Carús Guedes, J. V. (2020). Translocation of chlorantraniliprole and cyantraniliprole applied to corn as seed

- treatment and foliar spraying to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 15(4), e0229151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229151>
- Qi, S., Zhu, L., Wang, D., Wang, C., Chen, X., Xue, X., Wu, L. (2020). Flumethrin at honey-relevant levels induces physiological stresses to honey bee larvae (*Apis mellifera* L.) *in vitro*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110101. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110101>
- Rajan, S., Parween, M., Raju, N.J. (2023). Pesticides in the hydrogeo-environment: a review of contaminant prevalence, source and mobilisation in India. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-33. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01608-6>
- Ravinder N., Harpreet S., Santanu M. (2023). Insect pollinators decline: an emerging concern of Anthropocene epoch, *Journal of Apicultural Research*, 62, 23-38, <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2088931>
- Reis, A. B., de Oliveira, M. S., dos Santos Souza, D., Gomes, D. S., da Silva, L. L., Martínez, L. C., Serrão, J. E. (2024a). Exploring the effects of the acaricide cyflumetofen on the vital organs of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) workers. *Science of The Total Environment*, 929, 172640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172640>
- Reis, A. B., Martínez, L. C., de Oliveira, M. S., Souza, D. D. S., Gomes, D. S., Silva, L. L. D., Serrão, J. E. (2024b). Sublethal effects induced by a cyflumetofen formulation on honeybee *Apis mellifera* L. Workers: Assessment of midgut, hypopharyngeal glands, and fat body integrity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(11), 2455-2465. <https://doi.org/10.1002/etc.5980>
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron*, 41(5), 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>

- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P., Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83. <https://doi.org/10.1051/apido:2004071>
- Santos, D. E., Zanuncio, J. C., de Oliveira, A. A. G., Serrão, J. E. (2022). Endocrine cells in the midgut of bees (Hymenoptera: Apoidea) with different levels of sociability. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 394-398. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1158535>
- Santos, D. E., Azevedo, D. O., Campos, L. A. O., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2015). *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma*, 252, 619-627. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0707-z>
- Sattelle, D.B., Cordova, D. Cheek, T.R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience* 8, 107. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0076-4>
- Serra, R. S., Cossolin, J. F. S., de Resende, M. T. C. S., de Castro, M. A., Oliveira, A. H., Martínez, L. C., Serrão, J. E. (2021). Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, 270, 129439. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129439>
- Serra, R. S., Martínez, L. C., Cossolin, J. F. S., Resende, M. T. C. S. D., Carneiro, L. S., Fiaz, M., Serrão, J. E. (2023) The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology* 32, 234–242. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02633-y>
- Serrão, J.E., Cruz- Landim, C. (1995). The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 83: 229-235.

- Serrão, J.E., Plata-Rueda, A., Martínez, L.C. Zanuncio, J.C (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: a mini-review. *Science of Nature* 109, 17. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01788-8>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Silva-Zacarin, E.C.M., Taboga, S.R., de Moraes, R.S. (2008). Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Micron*, 39(2), 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.12.001>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., Strachecka, A. (2021). Fat Body—Multifunctional Insect Tissue. *Insects*, 12(6), 547. <https://doi.org/10.3390/insects12060547>
- Slater, G. P., Yocum, G. D., Bowsher, J. H. (2020). Diet quantity influences caste determination in honeybees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1927), 20200614. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0614>
- Sonmez Oskay, G., Uygur, G. S., Oskay, D., Arda, N. (2023). Impact of stress factors internal and external to the hive on honey bees and their reflection on honey bee products: a review. *Journal of Apicultural Research*, 64, 226-241. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2247840>
- Stefanini, M., Martino, C.D., Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174. <https://doi.org/10.1038/216173a0>
- Tadei, R., Menezes-Oliveira, V.B., Silva-Zacarin, E. C. (2020). Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. *Environmental Pollution*, 267, 115622. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115622>

- Teixeira, A. D., Marques-Araújo, S., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2015). Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron*, 68, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.09.009>
- Toprak, U., Doğan, C., Hegedus, D. (2021). A comparative perspective on functionally-related, intracellular calcium channels: the insect ryanodine and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Biomolecules*, 11(7), 1031. <https://doi.org/10.3390/biom11071031>
- Tsikakos, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1-2), 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- VanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One*, 4(8), e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Xu, K., Lan, H., He, C., Wei, Y., Lu, Q., Cai, K., Lv, J. (2022). Toxicological effects of trace amounts of pyriproxyfen on the midgut of non-target insect silkworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105266. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105266>
- Wade, A., Lin, C. H., Kurkul, C., Regan, E. R., Johnson, R. M. (2019). Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. *Insects*, 10(1), 20. <https://doi.org/10.3390/insects10010020>
- Wan, P. J., Guo, W. Y., Yang, Y., Lü, F. G., Lu, W. P., Li, G. Q. (2014). RNAi suppression of the ryanodine receptor gene results in decreased susceptibility to chlorantraniliprole in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 63, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.009>

- Wang, F., Wang, Y., Li, Y., Zhang, S., Shi, P., Li-Byarlay, H., Luo, S. (2022). Pesticide residues in beebread and honey in *Apis cerana cerana* and their hazards to honey bees and human. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113574>
- Wang Ying, W. Y., Ma LanTing, M. L., Zhang WeiXing, Z. W., Cui XuePei, C. X., Wang HongFang, W. H., Xu BaoHua, X. B. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47, 1, 48-56. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0374-x>
- Weber, E. (2013). *Apis mellifera*: The domestication and spread of European honey bees for agriculture in North America. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:3681326>
- Williams, G. R., Tarpy, D. R., Chauzat, M. P., Cox-Foster, D. L., Delaplane, K. S., Neumann, P., Shutler, D. (2010). Colony Ccollapse Disorder in context. *Bioessays*, 32(10), 845. [https://https://doi.org/10.1002%2Fbies.201000075](https://doi.org/10.1002%2Fbies.201000075)
- Yang, Y., Wu, Y., Long, H., Ma, X., Shariati, K., Webb, J., Chen, J. (2023). Global honeybee health decline factors and potential conservation techniques. *Food Security*, 15(4), 855-875. <https://doi.org/10.1007/s12571-023-01346-84>
- Zhao, G., Guo, H., Zhang, H., Zhang, X., Qian, H., Li, G., Xu, A. (2020). Effects of pyriproxyfen exposure on immune signaling pathway and transcription of detoxification enzyme genes in fat body of silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168, 104621. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104621>
- Zioga, E., Kelly, R., White, B., Stout, J. C. (2020). Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. *Environmental Research*, 189, 109873. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109873>

APÊNDICE

Tabela 1: Valores de p em seus respectivos testes estatísticos por órgão e técnica histoquímica.

Histoquímica	Órgão	Teste usado	p valor 12hs	p valor 24hs	p valor 48hs	p valor 72hs	p valor 96hs
Mercúrio de bromofenol	Intestino médio	Teste t (12h, 24h, 48h, 96h)	0.567	0.810	0.964	0.420	0.593
		Mann-Whitney (72h)					
Mercúrio de bromofenol	Corpo gorduroso	Teste t (12h, 24h, 48h, 96h)	0.702	0.250	0.336	0.150	0.930
		Mann-Whitney (72h)					
PAS	Intestino médio	Teste t (12h, 24h, 48h, 72h)	0.184	0.591	0.990	0.928	1
		Mann-Whitney (96h)					
PAS	Corpo gorduroso	Teste t (12h, 24h, 48h, 96h)	0.856	0.111	0.783	0.015	0.110
		Mann-Whitney (72h)					

Tabela 2: Valores estatísticos para catalase (CAT).

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Teste t	-0.799	8.53	0.446	Não significativo
24h	Mann-Whitney	42	-	0.904	Não significativo
48h	Teste t	1.71	15.7	0.107	Não significativo
72h	Teste t	2.36	21.2	0.027	Não significativo
96h	Mann-Whitney	106	-	0.370	Não significativo

Tabela 3: Valores estatísticos para superóxido dismutase (SOD).

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Teste t	-0.895	6.85	0.401	Não significativo
24h	Mann-Whitney	39	-	0.965	Não significativo
48h	Mann-Whitney	80	-	0.649	Não significativo
72h	Teste t	-1.07	20.9	0.296	Não significativo
96h	Mann-Whitney	-0.216	-0.216	0.832	Não significativo

Tabela 4: Valores estatísticos para malonaldeído (MDA).

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Teste t	0.417	11.406	0.683	Não significativo
24h	Teste t	1.121	8.660	0.292	Não significativo
48h	Teste t	-0.207	10.304	0.839	Não significativo
72h	Teste t	0.233	10.954	0.819	Não significativo
96h	Mann-Whitney	36	-	0.164	Não significativo

Tabela 5: Valores estatísticos para óxido nítrico (NO)

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Teste t	0.856	8.048	0.416	Não significativo

24h	Mann-Whitney	27	-	0.474	Não significativo
48h	Teste t	-1.602	21.333	0.123	Não significativo
72h	Mann-Whitney	94	-	0.649	Não significativo
96h	Mann-Whitney	120	-	0.150	Não significativo

Tabela 6: Valores estatísticos para proteína carbonilada (PC)

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Mann-Whitney	18	-	1.000	Não significativo
24h	Mann-Whitney	56.5	-	0.321	Não significativo
48h	Teste t	-0.194	16.311	0.848	Não significativo
72h	Mann-Whitney	79.5	-	0.817	Não significativo
96h	Mann-Whitney	37	-	0.001	Significativo

Tabela 7: Valores estatísticos para capacidade antioxidante total (TAC).

Horário	Teste estatístico	Estatística	DF	p valor	Resultado
12h	Teste t	0.199	7.898441	0.846	Não significativo
24h	Teste t	-0.168	12.650309	0.868	Não significativo
48h	Mann-Whitney	99	-	0.119	Não significativo

72h	Teste t	-2.126	12.768720	0.053	Não significativo
96h	Mann-Whitney	73	-	0.003	Significativo
