

DAVY SOARES GOMES

**O FUNGICIDA FLUAZINAM INDUZ MORTE CELULAR NO INTESTINO MÉDIO
E ALTERA COMPORTAMENTO DA ABELHA SEM FERRÃO *Partamona helleri*
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

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: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

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

T

G633f
2023
Gomes, Davy Soares, 1995-
O fungicida fluazinam induz morte celular no intestino
médio e altera comportamento da abelha sem ferrão *Partamona
helleri* (Hymenoptera: Apidae) / Davy Soares Gomes. – Viçosa,
MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (33 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 23-31.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.186>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas sem ferrão - Comportamento - Efeito dos
fungicidas. 2. Abelhas sem ferrão - Morfologia - Efeito dos
fungicidas. 3. Fluazinam (Fungicida). 4. Plantas forrageiras -
Efeito dos fungicidas. I. Serrão, José Eduardo, 1965-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799


DAVY SOARES GOMES

**O FUNGICIDA FLUAZINAM INDUZ MORTE CELULAR NO INTESTINO MÉDIO
E ALTERA COMPORTAMENTO DA ABELHA SEM FERRÃO *Partamona helleri*
(HYMENOPTERA: APIDAE)**


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: 27 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 DAVY SOARES GOMES
Data: 14/04/2023 15:03:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Davy Soares Gomes
Autor

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO SERRAO
Data: 14/04/2023 15:14:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Eduardo Serrão
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial o Departamento de Biologia Geral e o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade, em especial a secretária Beth e a todos professores que contribuíram com minha formação.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo e financiamento (APQ-03267-18).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq – 303467/2018-5) pelo financiamento.

Ao professor e orientador José Eduardo Serrão pela oportunidade de orientação, ensinamentos, responsabilidade, profissionalismo e principalmente confiança em mim para realizar esse trabalho.

Ao coorientador Kenner Morais Fernandes e Franciane Rosa Miranda pelos ensinamentos, apoio e contribuição durante todo andamento do trabalho, muito obrigado!

Ao meu Pai Antônio Sergio e minha Mãe Joaquina, e toda minha família e amigos por sempre estar ao meu lado, incentivando e me apoiando nessa caminhada. A minha namorada Rhaissa. Vocês são muito importantes em mais essa conquista e sempre serei grato.

Aos amigos que fiz nesses dois anos no Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo auxílio na pesquisa, ensinamentos e pelas horas de distrações e conversas que me ajudaram muito durante todo o trabalho.

Ao Apiário da Universidade Federal de Viçosa pelo fornecimento do material utilizado e por sua grande disposição;

Aos professores(as) que participaram da banca avaliadora e pela contribuição no trabalho.

Enfim, agradeço a todos que fazem parte desta conquista. Muito obrigado!

RESUMO

GOMES, Davy Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **O fungicida fluazinam induz morte celular no intestino médio e altera o comportamento da abelha sem ferrão *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae).** Orientador: José Eduardo Serrão.

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Apinae: Meliponini) desempenham um papel importante no ecossistema, atuando na polinização de plantas nativas. Dentre as abelhas sem ferrão, *Partamona helleri* encontrada do Sul ao Nordeste do Brasil, poliniza culturas de feijão, eucalipto entre outras e, durante sua atividade de forrageio elas ficam sujeitas à exposição de diferentes agroquímicos. O fungicida fluazinam é utilizado em lavouras no combate de fungos ascomicetos que causam doenças como mofo branco, e a sua ingestão pode causar consequências negativas no intestino médio das abelhas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fungicida fluazinam na mortalidade, morfologia do intestino médio e no comportamento em operárias forrageiras de *P. helleri*. As operárias forrageiras foram alimentadas com uma dieta de solução aquosa de mel 50% contendo a formulação comercial do fluazinam (0.5, 1.5 e 2.5 mg i.a./L⁻¹, concentração de campo determinada pelo fabricante) por 24h. Subsequente, utilizando apenas a concentração (2.5 mg i.a./L⁻¹) foi analisada a morfologia e marcadores de proteínas em vias de autofagia e apoptose no intestino médio e, comportamentos das operárias forrageiras. Após 24h de exposição ao fluazinam, todas as abelhas permaneceram vivas, porém, ocorreu uma redução no consumo alimentar do grupo tratado em comparação ao controle. O fluazinam causou alterações morfológicas no epitélio do intestino médio, com as células digestivas apresentando aumento da vacuolização citoplasmática, fragmentos de cromatina nuclear condensado, desorganização das bordas em escova e liberação de fragmentos celulares no lúmen intestinal. Essas características são indicativas de morte celular no epitélio do intestino médio que foram confirmadas com a marcação de LC3/AB e caspase-3 clivada associadas a autofagia e apoptose, respectivamente. Além disso, a exposição ao fluazinam diminuiu a distância percorrida e velocidade média, aumentando o número e tempo de parada, sendo alterações no comportamento que pode prejudicar na atividade de forrageio das abelhas. Os resultados mostram que o fluazinam em concentrações indicadas não é letal para as operárias forrageiras de *P. helleri*, porém, apresenta efeitos colaterais no intestino médio e no comportamento que possam representar riscos potenciais para estes polinizadores.

Palavras-chave: Agroquímicos. Forrageiras. Morfologia. Zignal®.

ABSTRACT

GOMES, Davy Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **The fungicide fluazinam induces cell death in the midgut and alters the behavior of the stingless bee *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae).** Advisor: José Eduardo Serrão.

Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae: Meliponini) play an important role in the ecosystem, acting in the pollination of native plants. Among the stingless bees, *Partamona helleri* found from the South to the Northeast of Brazil, pollinates bean and eucalyptus crops, among others, and during their foraging activity they are subject to exposure to different agrochemicals. The fluazinam fungicide is used in crops to combat ascomycete fungi that cause diseases such as white mold. The ingestion of the same can cause negative consequences in the midgut of the bees, because it is an organ of absorption of the nutrients. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of the fungicide fluazinam on mortality, midgut morphology and behavior in forage workers of *P. helleri*. Forage workers were fed a diet of 50% aqueous honey solution containing the commercial formulation of fluazinam (0.5, 1.5 and 2.5 mg a.i./L-1, field concentration determined by the manufacturer) for 24h. Subsequently, using only the concentration (2.5 mg a.i./L-1) the morphology and markers of proteins in autophagy and apoptosis pathways in the midgut and behavior of forage workers were analyzed. After 24 hours of exposure to fluazinam, all bees remained alive, however, there was a reduction in food consumption in the treated group compared to the control. Fluazinam caused morphological changes in the midgut epithelium, with digestive cells showing increased cytoplasmic vacuolation, fragments of condensed nuclear chromatin, disorganization of brush borders and release of cell fragments into the intestinal lumen. These characteristics are indicative of cell death in the midgut epithelium that were confirmed with LC3/AB and caspase-3 staining associated with autophagy and apoptosis, respectively. In addition, exposure to fluazinam decreased the distance covered and average speed, increasing the number and time of stop, being changes in behavior that may impair the foraging activity of bees. The results show that fluazinam at indicated concentrations is not lethal for *P. helleri* forage workers, however, it has side effects on the midgut and on behavior that may represent potential risks for these pollinators.

Keywords: Agrochemicals. Foragers. Morphology. Zignal®.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.1. Abelhas sem ferrão	7
1.2. Agroquímicos e abelhas	7
1.3. Intestino médio de abelhas	8
1.4. Efeitos de agroquímicos no intestino médio de abelhas	9
1.5. Autofagia e apoptose em células do intestino médio de abelhas	10
1.6. Agroquímicos afetam o comportamento em abelhas	10
1.7. Fluazinam	11
2. Objetivo	12
3. Materiais e métodos	12
3.1. Insetos	12
3.2. Bioensaio de concentração-mortalidade	12
3.3. Histologia do intestino médio	13
3.4. Imunofluorescência	13
3.5. Bioensaio comportamental	14
3.6. Análise estatística	15
4. Resultados	15
4.1. Bioensaio de concentração-mortalidade e consumo alimentar	15
4.2. Efeito da exposição ao fluazinam na morfologia e morte celular no intestino de operárias forrageiras de <i>P. helleri</i>	16
4.3. Alteração no comportamento das operárias forrageiras de <i>P. helleri</i> após exposição ao fluazinam	19
5. Discussão	19
6. Conclusão	22
7. Referências bibliográficas	23
Apêndice 1	32
Apêndice 2	33

1. Introdução

1.1. Abelhas sem ferrão

As abelhas são consideradas as mais eficazes no processo de polinização devido a sua visita floral para coleta de néctar e pólen como fonte de alimento, como consequência benéfica dessa atividade acabam fornecendo um serviço para o ecossistema (Klein et al., 2007; Roubik, 2014). Além da polinização, as abelhas também são conhecidas por sua relevância econômica através da produção de mel (Soares et al., 2017).

Dentre as abelhas, as abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Apinae: Meliponini) são encontradas em regiões tropicais e subtropicais com maior diversidade registrada no Brasil (Cham et al., 2019), desempenhando um papel importante na polinização de até 90% das plantas nativas (Pedro, 2014; Grüter, 2020). As abelhas sem ferrão são consideradas generalistas pelo fato que forrageiam em ampla diversidade de tipos florais e são bem diversificadas em relação a morfologia, tamanho da colônia, comportamento e nidificação (Hrncir et al., 2016). Classificadas como abelhas eusociais, significa que vivem em colônias com divisão de trabalho composta por duas castas, sendo dezenas ou centenas de milhares de operárias (fêmeas modificadas, apresentando ferrão atrofiado, incapazes de ferocar) e geralmente apenas uma rainha fecundada (Michener, 2013). Dentre a divisão de trabalho, as operárias forrageiras ou campeiras tem função de coletar alimentos (pólen e néctar), resina, água e até mesmo barro para construção e manutenção do ninho (Kleinert et al., 2009; Michener, 2013)

Partamona helleri Friese, 1900 (Hymenoptera: Apidae: Apinae: Meliponini) é uma espécie de abelha sem ferrão do gênero *Partamona* Schwarz (1939) que abrangem cerca de 33 espécies descritas, com ocorrência em áreas neotropicais desde o sul do Brasil até o México, em locais de matas, cerrados, caatingas e regiões montanhosas (Camargo & Pedro, 2003). *P. helleri* é conhecida popularmente como boca-de-sapo, devido a característica de entrada do ninho, encontrada do Sul ao Nordeste do Brasil acompanhando a mata atlântica, com ocorrência no cerrado de Minas Gerais e também, com relatos áreas urbanas (Camargo & Pedro, 2003). Possuem grandes importâncias na polinização de algumas plantas cultivadas como feijão guandu (Azevedo et al., 2007), eucaliptos, limão (Carvalho et al., 1999; Pedro & Camargo, 2003), laranja e girassol (Relatório temático sobre Polinização e Produção de Alimentos no Brasil – BPBES).

1.2. Agroquímicos e abelhas

Diante da importância dos polinizadores, alterações em suas populações podem causar um grande prejuízo econômico nas produtividades agrícolas, estimado em cerca de €153

bilhões/ano euros (Gallai et al., 2009). Alterações na população de abelhas podem ser ocasionadas por diversos fatores combinados, como, mudanças climáticas, perda de habitat, parasitas, introdução e manejo de espécies exóticas (Freitas et al., 2009; Van Engelsdorp et al., 2009; Gill et al., 2012; Goulson et al., 2015; Castilhos et al., 2019). Além desses fatores, a intensificação agrícola com uso indiscriminado de agroquímicos vem sendo um dos principais fatores apontados pela ação antrópica (Freitas et al., 2009; Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019), deixando um alerta para o declínio da população desses polinizadores.

O Brasil é atualmente o maior consumidor de agroquímicos do mundo (Dos Santos et al., 2018), dentre eles, os fungicidas, que são utilizados no combate a doenças fúngicas de plantas (Legard et al., 2001). Com aplicações normalmente em épocas de floração (Legard et al. 2001), as abelhas durante sua atividade de forrageio estão sujeitas a exposição a esse agroquímico através do contato com flores e solo contaminados, durante o vôo por gotículas do produto no ar (Lima et al., 2016) e por meio oral durante a ingestão de néctar e pólen contaminados (Del Sarto, 2014). As exposições por agroquímicos, como o espinosade, podem trazer inúmeros efeitos negativos comprometendo o desenvolvimento das abelhas *P. helleri* (Araújo et al., 2019a). Além dos efeitos individuais, a exposição ao mesmo também pode prejudicar o desenvolvimento da colônia (Tomé et al., 2015; Lima et al., 2016; Castilhos et al., 2019).

1.3. Intestino médio das abelhas

O canal alimentar dos insetos é um tubo contínuo da boca até o ânus, dividido em três regiões bem definidas, anterior, médio e posterior com parede intestinal apresentando uma única camada de epitélio de revestimento associada a tecido muscular. A região anterior e posterior, denominada de intestino anterior (estomodeu) e intestino posterior (proctodeum), tem origem ectodérmica, apresentando uma camada cuticular conhecida como cutícula íntima. O intestino anterior está relacionado a condução e armazenamento de alimentos, dividido em faringe, esófago, papo e proventrículo, com uma camada de epitélio de revestimento com células achatadas e uma íntima cutícula esclerotizadas. A região média ou intestino médio (mesentério) possui um revestimento epitelial com células colunares envolvidas na produção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. E por fim o intestino posterior, também diferenciado em três regiões, piloro, íleo e reto, com função de eliminar os resíduos alimentares e reabsorção de água. O piloro é região de conexão com o intestino médio a qual os restos alimentares e as secreções dos túbulos de Malpighi se misturam, e são conduzidas até o reto onde ocorre absorção de água e logo em seguida os restos alimentares são eliminados. O epitélio

de revestimento é composto por células colunares com cutícula fina e não esclerotizada, o que permite facilitar a permeabilidade no processo de absorção de água (Chapman, 2013).

O intestino médio é fundamental na sobrevivência das abelhas devido a sua atividade de absorção de nutrientes (Denecke et al., 2018). O intestino médio é um órgão tubular revestido por epitélio de camada única com células digestivas colunares com função de sintetizar enzimas digestivas, possuem microvilosidades (“Borda em escova”), responsáveis pela absorção de nutrientes (Carneiro et al., 2018; Oliveira et al., 2019); células endócrinas importantes na produção de hormônios que controlam a digestão (Souza et al., 2016); e células regenerativas relacionadas à renovação do epitélio (Martins et al., 2006). E por ser derivado da endoderme, o intestino médio não possui um revestimento cuticular, porém apresenta uma estrutura acelular, quitinosa e multifuncional denominada de matriz peritrófica (Teixeira et al., 2019).

1.4. Efeito de agroquímicos no intestino médio de abelhas

As exposições orais a determinados agroquímicos podem causar danos na morfologia do intestino médio de abelhas, assim como foi observado por Farder-Gomes et al., (2021a) utilizando o inseticida fipronil. A exposição ao fipronil induziu danos nas células do intestino médio de *P. helleri*, incluindo a desorganização da borda em escova, ruptura da matriz peritrófica e liberação de fragmentos celular no lúmen, podendo prejudicar a renovação epitelial mediada por células regenerativas após a lesão (Farder-Gomes et al., 2021a). A exposição ao inseticida lambda-cialotrina (Castro et al., 2020), e tiametoxam (Miotelo et al., (2022) também causaram danos no epitélio de intestino médio de *A. mellifera* e *P. helleri* respectivamente, semelhante ao informado anteriormente no estudo com fipronil.

A exposição oral aos fungicidas também induz danos celulares no intestino médio de abelhas, assim como observado por Hang et al., (2023) em *Apis cerana cerana*. Dose de azoxistrobina, piraclostrobina e boscalida causou alterações nas células digestivas do intestino médio, observando aumento dos espaços intercelulares, desorganização da borda estriada e variados níveis de vacuolização (Hang et al., 2023). Dependendo do tipo de fungicida, esses danos no intestino médio podem ser ainda mais severos, como observado após exposição do fungicida piraclostrobina em *Melipona scutellaris* e abelhas recém emergidas de *A. mellifera*, provocando liberação de fragmentos celular, alterações morfológicas dos ninhos de células regenerativas e núcleos com cromatina condensada (Domingues et al., 2020a; 2020b). Além disso, o fungicida piraclostrobina induziu uma menor atividade de secreção demonstrando a alta vulnerabilidade desse órgão aos agroquímicos (Domingues et al., 2020a; 2020b).

1.5. Autofagia e apoptose em células do intestino médio de abelhas

A autofagia é um processo de degradação de componentes citoplasmáticos que são circundados por um compartimento de dupla membrana denominado de autofagossomos, eles se fundem aos lisossomos formando um autolisossomo por onde ocorre a quebra das moléculas por meio de enzimas hidrolases (Hansen & Johansen, 2011). É um mecanismo de controle da homeostase celular e sobrevivência, protegendo as células contra macromoléculas desnecessárias (gera nutrientes através de degradação dessas macromoléculas), patógenos e danos celulares como as organelas que podem se desenvolver e causar danos irreversíveis ao DNA (Hansen & Johansen, 2011). Estudos utilizam proteínas marcadoras de autofagia para determinar atividades autofágica na célula, uma dessas é a proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (LC3), sendo proteínas associadas á membrana do autofagossomos utilizada para identificar o mesmo no processo de autofagia (Tanida et al., 2004). Em células do intestino de abelhas *P. helleri* foi possível visualizar esse evento através das marcações LC3 após exposição ao spinosad (Araújo et al., 2019b) e uma mistura de herbicidas Mesotrione e Atrazina (Araújo et al., 2021).

Apoptose é uma morte celular programada, onde as células ativam uma sequência de eventos moleculares para se autodestruir e seus restos formam fragmentos que serão fagocitadas por uma célula fagocítica (Grivicich et al., 2007). Em caso de um evento específico a ativação desse processo mediado por duas principais classes de caspases que ativará a via apoptótica, a caspase iniciadora ativará as caspases executoras (caspase-3 clivada) (Asadi et al., 2022). A caspase-3 clivada é uma proteína utilizada para observar apoptose celular, no intestino médio de abelhas foram possível identificar o aumento de células gigestivas marcadas para caspase-3 clivada, após exposição ao inseticida spinosad em *A. mellifera* (Araújo et al., 2019b) e fipronil em *P. helleri* (Farder-Gomes et al., 2021a). Em casos mais severos, onde as células sofrem danos irreversíveis podem ocasionar necrose celular liberando seu conteúdo no meio extracelular, sendo observado no intestino médio de *A. mellifera* após exposição ao fungicida iprodiona, indicando que houve necrose celular (Carneiro et al., 2020).

1.6. Agroquímicos afetam o comportamento em abelhas

Durante a atividade de forrageio das abelhas, elas estão sujeitas a exposição de diferentes tipos de agroquímicos que além de afetarem o intestino médio, o comportamento das abelhas também pode ser comprometido. Estudos recentes mostram alterações na distância percorrida e velocidade média de forrageiras de *P. helleri* após exposição ao inseticida fipronil (Farder-Gomes et al., 2021b) e uma mistura de herbicidas mesotrione e atrazina (Araújo et al.,

2021), em ambos as análises foram realizadas através de um software (Ethoflow). Ethoflow é um software que usa visão computacional e aprendizado de máquina para avaliação multivariada de comportamento cinemático (Bernardes et al., 2021). Além disso, a exposição ao fipronil causou danos estruturais no cérebro, o que pode responder a essa mudança comportamental das operárias após intoxicação (Farder-Gomes et al., 2021b). Em *Melipona quadrifasciata*, usando também o software Ethoflow para análise comportamental após exposição ao imidacropido, as abelhas percorreram uma menor distância e ficaram mais tempo parada, consequentemente prejudicar na atividade de forrageio e até na sobrevivência do polinizador (Bernauer et al., 2015; Bernardes et al., 2022a).

1.7. Fluazinam

O fluazinam dinitroanilina ([3-cloro- *N*- (3-cloro-5-trifluorometil-2-piridil)- α , α , α -trifluoro-2, 6-dinitro-*p*-toluidina]) é um fungicida do grupo fenilpiridinamina, amplamente utilizado na agricultura combatendo fungos como ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* que causa doença em centenas de espécies de plantas no mundo (Boland & Hall, 1994; Wang et al., 2018). Dentre as doenças, a podridão do caule e da raiz é conhecido como mofo branco e pode resultar na redução da qualidade e produção (Bolton et al., 2006). O fluazinam possui ação sistêmica rápida, atingindo mitocôndrias das células fúngicas interrompendo o processo de produção de energia por meio de desacoplamento da fosforilação oxidativa (Guo et al., 1991; Mao et al., 2018). O mecanismo de desacoplamento ocorre devido a protonação/desprotonação do grupo amino em sua cadeia estrutural (Guo et al., 1991; Mao et al., 2018). O desacoplamento da fosforilação oxidativa pelo fungicida, provoca uma inibição do processo de síntese de ATP (Vioratos, 2014; Hou et al., 2019). Além da redução na síntese de ATP, o fluazinam induz aumento das espécies reativas de oxigênio através da inibição do complexo mitocondrial I, ocasionando um aumento de estresse oxidativo e posteriormente provocar morte celular em neuroblastoma humano SH-SY5Y (Ott et al., 2007; Lee et al., 2011). O que foi comprovado pelo fator de transcrição p53 e ativação das caspase-3 causando morte celular apoptótica induzida pelo fluazinam (Lee et al., 2011).

Estudos com este fungicida em organismos não-alvos terrestres são escassos, já em organismos aquáticos o fungicida é bem estudado e demonstra-se altamente tóxico sendo letal em uma variedade de espécies de peixes (Kolanczyk et al., 2018; Wang et al., 2018; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2020; Werner et al., 2021) sendo o fungicida de maior impacto para animais de água doce (Räsänen et al., 2015). No peixe *Danio rerio*, o fluazinam consegue induzir alterações nas concentrações de metabólitos, na regulação do hormônio de crescimento e na

transcrição de genes relevantes aos processos vitais em estágios iniciais de vida, afetando o crescimento em ambos os sexos (Wang et al., 2018; Zheng et al., 2018). Além disso a exposição crônica ao fluazinam demonstrou um aumento na morte celular através da análise da expressão de genes relacionados as enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase e de via de sinalização apoptótica caspase-3 em *D. rerio* (Wang et al., 2018).

Considerando que o fungicida fluazinam pode causar efeitos subletais em organismos não-alvos diante aos trabalhos já realizado com organismos aquáticos, juntamente com a importância ecológica e econômica das abelhas e o uso intensivo de agroquímicos na agricultura. É importante avaliar os efeitos letais e subletais deste fungicida nos polinizadores não-alvo, a fim de compreender os riscos ambientais devido ao uso em excesso.

2. Objetivo

Verificar se o fungicida fluazinam tem efeitos tóxicos em operárias forrageiras da abelhas-sem-ferrão *P. helleri*. Especificamente foram avaliadas a mortalidade, a morfologia do intestino médio e comportamento de operárias forrageiras de *P. helleri* após exposição oral ao fluazinam.

3. Materiais e métodos

3.1. Insetos

As operárias forrageiras de *P. helleri* foram obtidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. As abelhas foram coletadas em duas colônias diferentes com auxílio de um Erlenmeyer de vidro no momento da saída do ninho (Farder-Gomes et al., 2021b). Logo após a coleta, as operárias forrageiras, foram transferidas para recipientes de plásticos transparentes (500 mL) e mantidos no escuro em BOD durante 1h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa (Botina et al., 2020), após esse tempo foram realizados os bioensaios a seguir.

3.2. Bioensaio de concentração-mortalidade

A formulação comercial do fluazinam ZIGNAL® (formulação suspensão concentrada, 500 g ia L^{-1} e 780 g de ingredientes inertes L^{-1} ; FMC Química do Brasil Ltda, Campinas, SP, Brasil). Foram utilizadas três concentrações conforme o recomendado pelo fabricante para as culturas de feijão (0,5 mg i.a. mL^{-1}), soja (1,5 mg i.a. mL^{-1}) e batata (2,5 mg i.a. mL^{-1}).

Para o grupo tratado, as concentrações recomendadas foram diluídas em solução aquosa de mel (50% p/p) e em seguida, as operárias forrageiras foram alimentadas por um

período de 24h (exposição aguda). Enquanto as abelhas controles foram alimentadas apenas com a solução aquosa de mel a 50%. Os grupos tratados e controle foram alimentados com o auxílio de dois microtubos (1,5 mL) perfurados na extremidade e inseridos por orifícios na parede dos recipientes plásticos (250 mL) (Botina et al., 2020). Para cada concentração foram utilizadas duas colônias, dividida em quatro réplicas biológicas (recipiente) por colônia, sendo 10 operárias forrageiras em cada recipiente. Os recipientes contendo as abelhas foram mantidos no escuro em BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa durante 24h de exposição. A mortalidade foi avaliada durante 24h de exposição.

Os microtubos dos recipientes contendo as dietas do grupo tratado e controle foram pesados separadamente antes e após as 24h de exposição, em uma balança analítica (XS3DU, Mettler Toledo, Columbus, OH), para quantificar a quantidade de solução consumida pelas operárias forrageiras. Para o controle negativo, foi realizado a pesagem de microtubos com a dieta antes e depois das 24 h, mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa, mas sem expor às abelhas. O consumo alimentar foi registrado em microgramas (mg), correspondendo ao consumo médio das 10 abelhas de cada unidade experimental (Botina et al., 2020).

Para os próximos bioensaios, foi utilizada apenas a maior concentração recomendada pelo fabricante ($2,5 \text{ mg ia mL}^{-1}$).

3.3. Histologia do intestino médio

As operárias forrageiras expostas à concentração de ($2,5 \text{ mg ia mL}^{-1}$) do fungicida ($n=5$) e o grupo controle ($n=5$), após 24h, foram anestesiadas a -5°C por 3 minutos e dissecadas em NaCl 125 mM. Os intestinos médios foram transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) e permanecendo por 2h em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 99%) e embebidas em Histo-resina (Leica, Heidelberg, Alemanha), seccionadas a $2 \mu\text{m}$ de espessura com micrótomo Leica RM 2255 e coradas com hematoxilina (20 min) e eosina (2 minutos). As amostras foram analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Q-Color3 (Olympus Corp. Tokyo, Japan).

3.4. Imunofluorescência

A imunofluorescência para detecção de autofagia e apoptose foi realizada com o intestino médio de 10 operária forrageiras *P. helleri* tratadas com o fungicida e 10 do grupo

controle, totalizando 20 indivíduos dissecados em NaCl 125mM. Os intestinos médios foram transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 2h em temperatura ambiente. Após a fixação as amostras foram submetidas a três lavagens por 30 min cada, em tampão fosfato de sódio 0,15 M PH 7,2 (PBS) contendo 1% de Triton X-100 (PBST). As amostras foram incubadas separadamente (cinco intestinos médios para cada anticorpo) por 24h a 4°C, em solução de anticorpo comercial a 1% em PBS. Os anticorpos anti-LC3/AB (#3868T; 1:500) para detecção de autofagia e anti-caspase-3 clivada (Asp175, #9664; 1:500) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA; produzido em coelho) para detecção de morte celular por apoptose foram utilizados. As amostras incubadas com os anticorpos primários após 24h foram lavadas com PBS por três vezes durante 15 min cada e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) diluído 1:500 em PBS 0,1 M, por 24h, a 4°C no escuro. Após lavagem em PBS, as amostras foram transferidas para 2 µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Polysciences, Inc., Hayward, CA, USA) para coloração dos núcleos nucleares por 30 min, lavados com PBS e os intestinos foram montados em lâminas com solução de sacarose a 30%. As amostras foram analisadas em microscópio fluorescente Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). As células com imunofluorescência foram contadas ao longo de todo intestino médio das cinco amostras presentes no tratamento e no controle.

3.5. Bioensaio comportamental

O comportamento das forrageiras de *P. helleri* exposta ao fluazinam (2,5 mg ia mL⁻¹) e controle foi avaliado após 24h de exposição oral. As forrageiras foram divididas em arenas (placa de Petri com 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura) cobertas com filmes plásticos transparentes para evitar fugas e registrado durante 10 minutos com câmera de vídeo digital (30 quadros por segundo) sob luz artificial a 25 °C ± 2 (Farder-Gomes et al., 2022b). Após a gravação, foi utilizado o software Ethoflow® (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Brasil, BR 512020 000737– 6) (Bernardes et al., 2021) para analisar os arquivos de vídeo e calcular a velocidade média (cm s⁻¹), distância percorrida (cm), número e tempo (s) de paradas pelas abelhas (Bernardes et al., 2022a). Quatro operárias forrageiras em cada arena foram filmadas simultaneamente, sendo utilizado cinco arenas em cada tratamento de duas colônias, totalizando 40 abelhas. O software Ethoflow® permite a avaliação de vários indivíduos na mesma arena, mantendo as identidades individuais (Bernardes et al. 2021).

3.6. Análise estatística

Os dados de consumo alimentar foram comparados pelo teste *t*-Student, a 5% de probabilidade. Para cada variável de resposta dos dados de imunofluorescência (LC3/AB e Caspase-3), um modelo GLMs foi ajustado com distribuição de erro de Poisson; distribuição adequada para dados de contagem (Crawley, 2012). Os dados comportamentais (velocidade média, distância percorrida, número e tempo de parada das abelhas) foram comparados pelo teste *t*-Student, a 5% de probabilidade. Como as abelhas da mesma colônia foram monitoradas juntas na mesma arena, a colônia foi considerada um efeito aleatório. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2018).

4. Resultados

4.1. Bioensaio de concentração-mortalidade e consumo alimentar

Não houve mortalidade no grupo controle e tratado (concentrações recomendadas pelo fabricante) após 24h de exposição oral ao fluazinam, indicando que o fungicida não é letal para as operárias forrageiras de *P. helleri*.

O consumo alimentar analisado durante o experimento apresentou diferença ($t = 4,708$, $gl = 5$; $p = 0,0093$) entre os grupos, mostrando que as forrageiras tratadas com a maior concentração de fluazinam ($2,5 \text{ mg i.a. mL}^{-1}$) consumiram menos alimentos ($19 \text{ mg abelha}^{-1}$) em relação ao grupo controle ($24 \text{ mg abelha}^{-1}$; Figura 1), mostrando que cada operária forrageira tratada ingeriu $0,047 \text{ mg}$ do ingrediente ativo fluazinam em 24h.

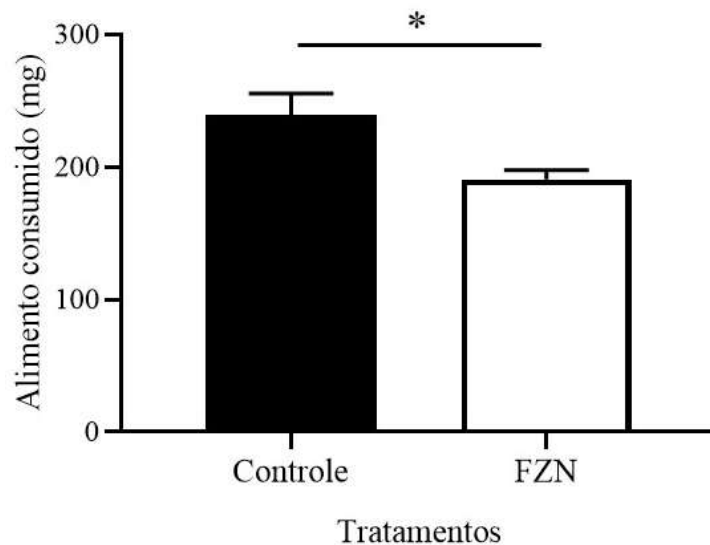


Figura 1. O consumo alimentar (média \pm sd) de operárias forrageiras de *Partamona helleri* tratadas com fluazinam, após 24h de exposição. * indica que diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

4.2. Efeito da exposição ao fluazinam na morfologia e morte celular do intestino médio de forrageiras de *P. helleri*

O intestino médio das forrageiras de *P. helleri* que foram alimentadas com a dieta sem o fungicida (controle), possui uma matriz peritrófica revestindo o lúmen, epitélio simples com células digestivas colunares contendo núcleos esféricos com cromatina descondensada (Figura 2A e 2B), presença de vacúolos citoplasmático e borda estriada apical bem desenvolvida (Figura 2B). As células regenerativas de menor tamanho estavam localizadas na região basal do epitélio em ninhos, com pequenos núcleos esféricos (Figura 2A e 2B).

Nas abelhas alimentadas por 24h com fluazinam, o intestino médio apresentou aumento na quantidade e volume de vacúolos citoplasmáticos nas células digestivas, liberação de fragmentos celulares no lúmen (Figura 2C e 2D). Também foi possível identificar degeneração da borda estriada e núcleos com fragmentos de cromatina condensada nas células digestivas (Figura 2E).

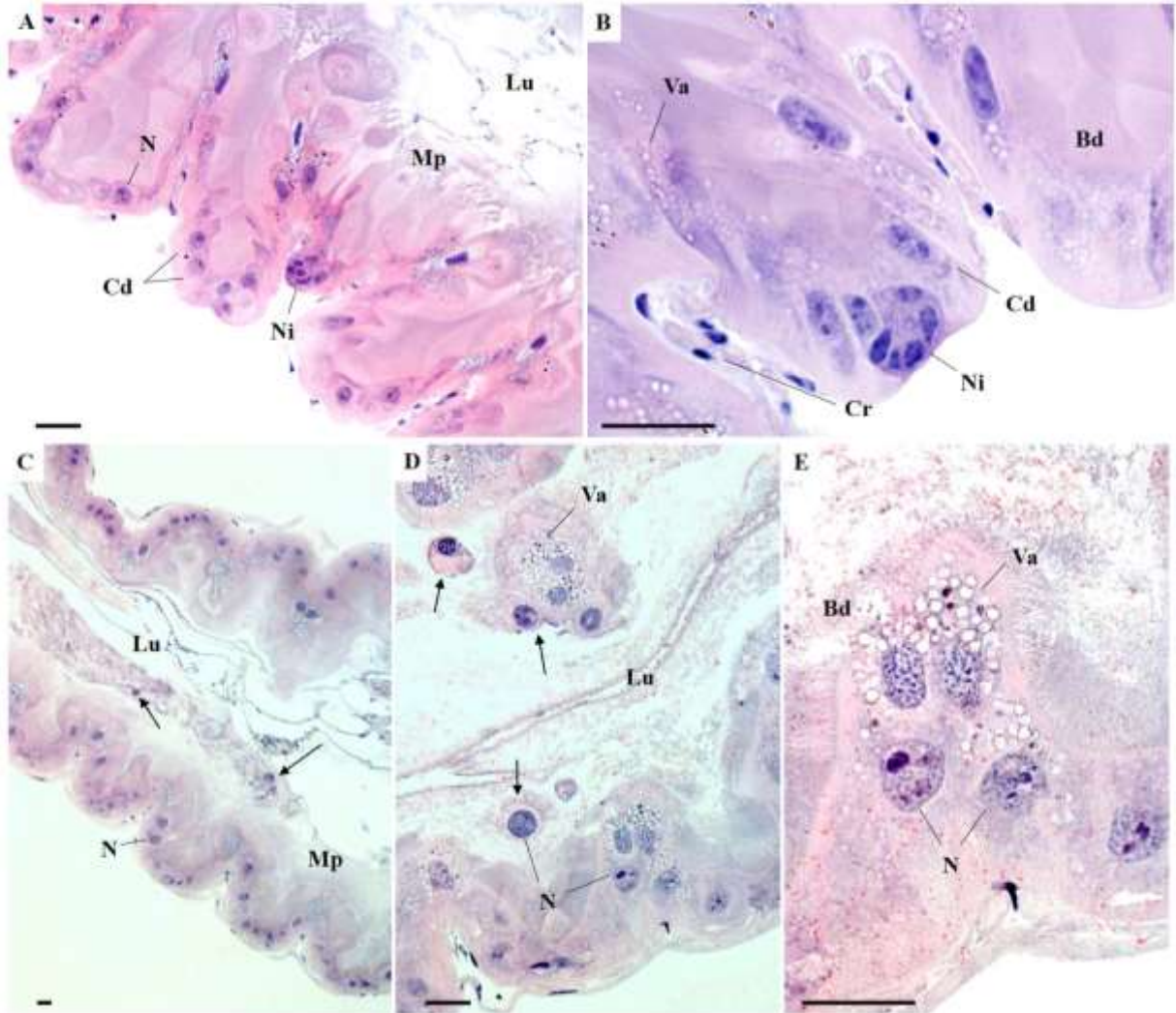


Figura 2. Micrografias de luz do intestino médio de *Partamona helleri* do controle (**A e B**) e do fluazinam (**C, D e E**). **A e B.** Intestino médio de forrageiras apresentando epitélio com células colunares digestivas (**Cd**) e células regenerativas (**Cr**), ninho de células regenerativas (**Ni**), núcleo (**N**), borda estriada, matriz peritrófica (**Mp**) e Lúmen (**Lu**). **C.** Vista geral do epitélio com células digestivas contendo núcleo (**N**) e grande concentração de vacuolização (**Va**) e fragmentos celulares no lúmen do intestino médio de forrageiras tratadas com fluazinam. **D.** Presença de fragmentos celulares (**seta**) no lúmen. **E.** Borda estriada danificada e presença de vacúolos citoplasmáticos (**Va**) nas células digestivas. Todas as barras de escala estão à: 30 μm .

O epitélio do intestino médio das operárias de forrageiras de *P. helleri* mostrou células positivas para autofagia e apoptose, com aumento de células positivas para LC3/AB ($3 \pm 1,58$ células; $\chi^2 = 6,95$; $gl = 8$; $p > 0,045$) e caspase-3 clivada ($4,8 \pm 1,48$ células; $\chi^2 = 7,36$; $gl = 8$; $p > 0,0002$) no intestino médio de operárias forrageiras após 24h de exposição ao fluazinam em relação ao grupo controle LC3/AB ($1,2 \pm 0,83$ células) e caspase-3 (1 ± 1 células) (Figura 3).

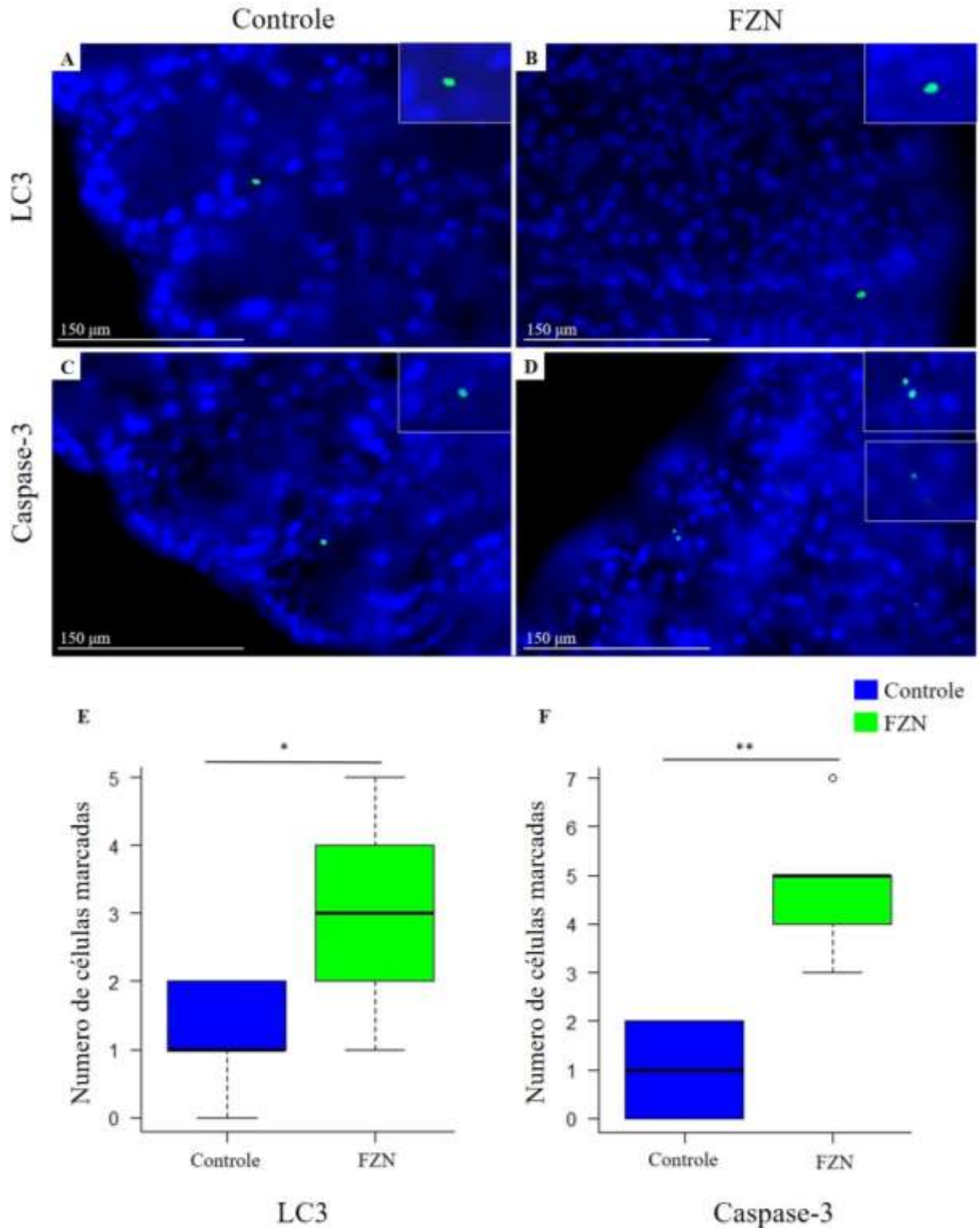


Figura 3. Intestino médio de operárias forrageiras de *Partamona helleri* apresentando células positivas (verde) para marcador de autofagia LC3/AB (A e B) e apoptose caspase-3 (C e D) nos grupos controle e tratado com fluazinam (FZN). Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). E. Número (médias \pm sd) de células positivas para LC3/AB. F. Número (médias \pm sd) de células positivas para caspase-3 clivada. * ($p < 0.05$) e ** ($p < 0.001$) indica diferenças na quantidade de células imunofluorescentes entre os grupos.

4.3. Alteração no comportamento das forrageiras de *P. helleri* após exposição ao fluazinam

O comportamento das abelhas operárias forrageiras foi avaliado para verificar possíveis alterações na velocidade média, distância percorrida e tempo de parada. As abelhas operárias forrageiras exposta ao fluazinam durante 24h apresentaram alterações em seu comportamento, diminuindo a velocidade média ($t = 3.052$; $gl = 8$; $p = 0.0158$; Figura 4A), a distância percorrida ($t = 2.733$; $gl = 8$; $p = 0.0257$; Figura 4B), aumentando o número de paradas ($t = 2.6384$; $gl = 8$; $p = 0.03$; Figura 4C) e ficando mais tempo em repouso ($t = 2.638$; $gl = 8$; $p < 0.001$; Figura 4D).

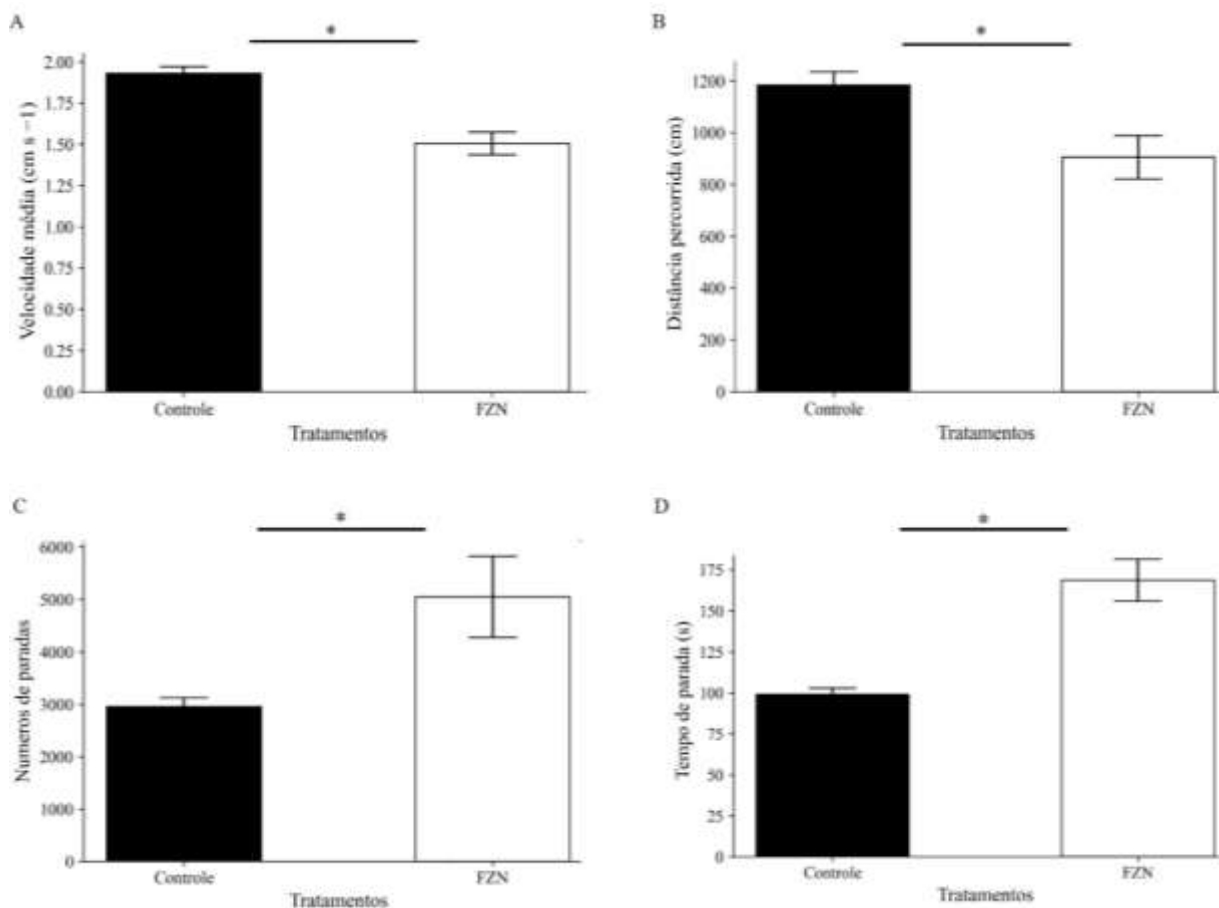


Figura 4. Comportamento de operárias forrageiras de *Partamona helleri* **A.** Velocidade média (cm s⁻¹) (média ± sd). **B.** Distância percorrida (cm) (média ± sd). **C.** Número de paradas (média ± sd). **D.** Tempo de repouso (s) (média ± sd). * indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

5. Discussão

Este é o primeiro estudo com bioensaio ecotoxicológico em abelhas utilizando fungicida fluazinam considerando as concentrações de campo recomendadas para o controle de

doenças fúngicas em algumas culturas polinizadas pela *P. helleri*. Assim, foi demonstrado que a formulação comercial de fluazinam em exposição aguda não causa mortalidade em abelha *P. helleri*, semelhante ao registro recente utilizando fungicida iprodiona em *A. mellifera* (Carneiro et al., 2022). Porém, a presença do fluazinam na dieta inibe o consumo alimentar de operárias forrageiras de *P. helleri*, resultando em um consumo de aproximadamente 0,047 (mg i.a. por abelha) em 24h, sendo que essa quantidade ingerida por cada indivíduo não foi suficiente para causar a mortalidade. Portanto, a redução do consumo de alimentar pode ser atribuída a alta concentração do composto químico presente na dieta das quais as abelhas foram expostas (Araújo et al., 2021). Assim, como relatado neste trabalho, as altas concentrações de fungicida Pristine (DeGrandi-Hoffman et al., 2015) e uma mistura de inseticidas (Zhu et al., 2017; Almasri et al., 2020) também reduziram o consumo alimentar em *A. mellifera*. Acreditando que o fator concentração do composto químico pode ter apresentado um efeito repelente na alimentação, interferido no consumo alimentar pelas operárias forrageiras após exposição ao fluazinam (Bernardes et al., 2017; Almasri et al., 2020).

Com base nos resultados histológicos obtidos, fluazinam causou danos celulares no intestino médio de *P. helleri*, como, aumento de vacúolos citoplasmáticos; borda estriadas desorganizada; fragmentos de cromatina nuclear condensada; e liberação de fragmentos celulares no lúmen intestinal. São danos observado após exposição ao fluazinam que também foram reportados para outros fungicidas, como estrobilurina (Batista et al., 2020) e iprodiona (Carneiro et al., 2022) no intestino médio de *A. mellifera*. Indicando que estes danos celulares no intestino médio de operárias forrageiras são semelhantes, independente do químico utilizado.

O aumento na quantidade e volume dos vacúolos citoplasmáticos juntamente com aumento de células positivas para proteínas LC3/AB nas células digestivas do intestino médio de *P. helleri*, indicam o processo de autofagia causada pelo fluazinam. Os vacúolos citoplasmáticos podem ser autofágicos, sendo um processo de proteção que as células apresentam por meio de degradação de compostos xenobióticos (Tanida et al., 2004). Relatos semelhantes aos resultados apresentados, foram observados em células do intestino médio de *A. mellifera* após exposição ao imidacloprido, com aumento da expressão do gene *atg1* relacionado a autofagia (Carneiro et al., 2022) e, em *P. helleri* a exposição ao espinosade com células positivas para LC3/AB (Araújo et al., 2019b). O processo de autofagia relatado no intestino médio de *P. helleri* pode evidenciar uma resposta das células digestivas para manter a homeostase celular e evitar maiores danos pela intoxicação ao fluazinam.

A eliminação de fragmentos celulares no lúmen intestinal e fragmentos de cromatina nuclear condensada é um indicador de morte celular induzida pelo fluazinam (Silva-Zacarin,

2007; Araújo et al., 2019b; Domingues et al., 2020b). Em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y o fluazinam demonstrou ser causador de danos oxidativos, inibindo o complexo mitocondrial I provocando a clivagem da caspase-3, uma proteína executora de morte celular por apoptose (Lee et al., 2011). Portanto, aumento da quantidade de células positivas para caspase-3 no intestino médio, comprova o processo de morte celular induzida por fluazinam, resultando em alterações morfológicas como foi observado a fragmentação no lúmen intestinal, e subsequente comprometimento na atividade desse órgão. Embora o anticorpo anti-caspase-3 clivada utilizado aqui tenha sido desenvolvido para a caspase-3 de humanos, ela apresenta reação cruzada para as caspases efetoras semelhantes DrICE e Dcp-1 em *Drosophila* (Fogarty & Bergmann, 2014) e tem sido eficiente também em *P. helleri* como encontrado por Fader-Gomes et al. (2021a) e os resultados aqui obtidos.

Os efeitos comportamentais causado pelo fluazinam nas operárias forrageiras de *P. helleri* foram similares aqueles relatados para esta abelha exposta ao espinosade (Araújo et al., 2019b), azadiractina (Bernardes et al., 2017) e sulfato de cobre (Bernardes et al., 2022b). A exposição ao fluazinam reduziu a velocidade média e distância percorrida, aumentando o número de paradas e ficando mais tempo em repouso, semelhante ao encontrado por Araújo et al. (2021) após exposição oral a uma mistura de herbicidas e Bernardes et al., (2022b) com sulfato de cobre em *P. helleri*. Essas alterações comportamentais podem ser uma estratégia para minimizar o gasto de energia (Brito et al., 2020), pois o consumo alimentar como relatado foi menor e o epitélio intestinal apresentou danos que podem prejudicar a disponibilidade energética que as abelhas necessitam para realizar suas atividades (DeGrandi-Hoffman et al., 2015; Mao et al., 2017). Diante que a desorganização na borda estriada, como observado no epitélio do intestino médio de operárias forrageiras pode comprometer sua função, uma vez que essa estrutura está relacionada à absorção de alimentos (Gonçalves et al., 2014), e com isso influenciar na redução da digestão de proteínas e outros nutrientes (DeGrandi-Hoffman et al., 2015).

Assim, como outros fungicidas, o fluazinam diminui a síntese de ATP nas mitocôndrias das células fúngicas, bloqueando atividade do complexo mitocondrial I (NADH-coenzima Q redutase) da cadeia transportadora de elétrons (Vioratos, 2014; Shao et al., 2015; Li et al., 2020; Souders II et al., 2021). Em *Bombus terrestris*, o complexo I em mitocôndrias do musculo de vôo foi inibido após tratamento com o fungicida difenoconazol, afetando a produção de ATP (Syromyatnikov et al. 2017). Nicodemos et al. (2020) em seu estudo com o fungicida piraclostrobina e DeGrandi-Hoffman et al. (2015) com o fungicida Pristine®, também relataram redução na atividade mitocondrial de *A. mellifera*, após a exposição aos

fungicidas, diminuindo a taxa de vôo das abelhas. Por fim, além da redução alimentar e absorção de nutrientes, o fluazinam pode estar afetando a bioenergética mitocondrial, causando uma redução na síntese de ATP e influenciando no comportamento das abelhas tratadas. Essas alterações nos parâmetros relacionados a movimentação das operárias forrageiras tratadas com fluazinam indica que mudanças ao nível individual que podem comprometer a reprodução, forrageio e conseqüentemente prejudicar a sobrevivência da colônia (Henry et al., 2012; Lima et al., 2015; Bernauer et al., 2015).

6. Conclusão

Os resultados mostram que a concentração recomendada pelo fabricante do fungicida fluazinam, não é letal as operárias forrageiras de *P. helleri* em exposição aguda. No entanto, o fungicida causa efeitos subletais incluindo danos em células digestivas do intestino médio induzindo morte celular autofágica e apoptótica, alterações no comportamento e consumo alimentar. Esses efeitos podem comprometer a saúde das abelhas e atividades de forrageio, prejudicando a qualidade de vida dos indivíduos. Diante dos impactos do fungicida, é necessário utiliza-lo com cautela devido aos efeitos colaterais aqui apresentados em um polinizador não-alvo.

7. Referências bibliográficas

- Almasri, H., Tavares, D. A., Pioz, M., Sené, D., Tchamitchian, S., Cousin, M., Brunet, J. L., Belzunces, L. P. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide, and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111013.
- Araújo, R. S., Bernardes, R. C., Fernandes, K. M., Lima, M. A. P., Martins, G. F., & Tavares, M. G. (2019a). Spinosad-mediated effects in the post-embryonic development of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Environmental Pollution*, 253, 11–18.
- Araújo, R. S., Lopes, M. P., Barbosa, W. F., Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Martins, G. F., & Tavares, M. G. (2019b). Spinosad-mediated effects on survival, overall group activity and the midgut of workers of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 175, 148–154.
- Araújo, R. S., Bernardes, R. C., & Martins, G. F., (2021). A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. *Science of the Total Environment*, 763, 142980.
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645.
- Azevedo, R. L., Carvalho, C. A. L. D., Pereira, L. L., & Nascimento, A. S. D. (2007). Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das flores do feijão guandu no Recôncavo Baiano, Brasil. *Ciência Rural*, 37, 1453–1457.
- Batista, A. C., Domingues, C. E. D. C., Costa, M. J., & Silva-Zacarin, E. C. M. (2020). Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees?. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 834–843.
- Bernardes, R. C., Tomé, H. V., Barbosa, W. F., Guedes, R. N., & Lima, M. A. P. (2017). Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. *Apidologie*, 48(3), 275–285.
- Bernardes, R. C., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., da Silva, C. B., & Martins, G. F. (2021). Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors*, 21(9), 3237.
- Bernardes, R. C., Botina, L. L., da Silva, F. P., Fernandes, K. M., Lima, M. A. P., & Martins, G. F. (2022a). Toxicological assessment of agrochemicals on bees using machine

- learning tools. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127344.
- Bernardes, R. C., Fernandes, K. M., Bastos, D. S. S., Freire, A. F. P. A., Lopes, M. P., de Oliveira, L. L., Tavares, M. G., Araújo, R. S., & Martins, G. F. (2022b). Impact of copper sulfate on survival, behavior, midgut morphology, and antioxidant activity of *Partamona helleri* (Apidae: Meliponini). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(4), 6294–6305.
- Bernauer, O. M., Gaines-Day, H. R., & Steffan, S. A. (2015). Colonies of bumble bees (*Bombus impatiens*) produce fewer workers, less bee biomass, and have smaller mother queens following fungicide exposure. *Insects*, 6(2), 478–488.
- Boland, G. J., & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16, 93–108.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P., & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular plant pathology*, 7(1), 1-16.
- Botina, L. L., Bernardes, R. C., Barbosa, W. F., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., & Martins, G. F. (2020). Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX*, 7, 100906.
- Camargo, J. M., & Pedro, S. R. (2003). Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3), 311–372.
- Carneiro, L. S., Teixeira, S. A. M. V., Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2018). Histochemistry, immunohistochemistry and cytochemistry of the anterior midgut region of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Micron*, 113, 41–47.
- 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.
- Carneiro, L. S., Martinez, L. C., De Oliveira, A. H., Cossolin, J. F. S., De Resende, M. T. C. S., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., & 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.
- Carvalho, C. A. L. D., Marchini, L. C., & Ros, P. B. (1999). Fontes de pólen utilizadas por *Apis*

- mellifera* L. e algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). *Bragantia*, 58(1), 49–56.
- Castilhos, D., Bergamo, G. C., Gramacho, K. P., & Gonçalves, L. S. (2019). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50(3), 263–272.
- Castro, M. B. A., Martinez, L. C., Cossolin, J. F. S., Serra, R. S., & Serrão, J. E. (2020). Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 248, 126075.
- Cham, K. O., Nocelli, R. C., Borges, L. O., Viana-Silva, F. E. C., Tonelli, C. A. M., Malaspina, O., Menezes, C., Rosa-Fontana, A. S., Blochtein, B., Freitas, B. M., Pires, C. S. S., Oliveira, F. F., Contrera, F. A. L., Torezani, K. R. S., Ribeiro, M. F., Siqueira, M. A. L., Rocha, M. C. L. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental entomology*, 48(1), 36–48.
- Chapman, R.F. *Insects: Structure and Function*. Vol. 5, Cambridge University Press formerly, University of Arizona. 2013.
- Crawley, M. J. (2007). *The R Book*. Chichester. UK: Wiley.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Watkins Dejong, E., Chambers, M. L., & Hidalgo, G. (2015). Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *Journal of economic entomology*, 108(6), 2518–2528.
- Del Sarto, M. C. L., Oliveira, E. E., Guedes, R. N. C., & Campos, L. A. O. (2014). Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 45(5), 626–636.
- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018). How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium?. *Insect biochemistry and molecular biology*, 103, 22–35.
- Domingues, C. E. D. C., Inoue, L. V. B., da Silva-Zacarin, E. C. M., & Malaspina, O. (2020a). Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces the survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111395.

- Domingues, C. E. D. C., Inoue, L. V. B., da Silva-Zacarin, E. C. M., & Malaspina, O. (2020b). Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. *Environmental Pollution*, 266, 115267.
- Dos Santos, C. F., Otesbelgue, A., & Blochtein, B. (2018). The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PloS One*, 13(7), e0200286.
- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021a). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of The Total Environment*, 774, 145679.
- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., de Oliveira, L. L., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021b). Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). *Science of The Total Environment*, 794, 148678.
- Fogarty, C. E. & Bergmann, A. (2014) Detecting caspase activity in *Drosophila* larval imaginal discs. In: Bozhkov, V. & Slvesen, G. (eds) *Caspases, Paracaspases, and Metacaspases. Methods in Molecular Biology*, vol. 1133, pp. 109-117. doi: 10.1007/978-1-4939-0357-3-7.
- Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. D. M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332–346.
- Gallai N., Salles J.M., Settle J., Vaissière B.E. (2009). Economic evaluation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810–821.
- Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105–108.
- Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Barcellos, M. S., Silva, F. P., Magalhaes-Junior, M. J., Zanuncio, J. C., Martins, G. F., & Serrao, J. E. (2014). Ultrastructure and immunofluorescence of the midgut of *Bombus morio* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). *Comptes Rendus Biologies*, 337(6), 365–372.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by

- combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.
- Grivicich, I., Regner, A., & da Rocha, A. B. (2007). Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*, 53(3), 335–343.
- Grüter, C. (2020). *Stingless Bees*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Guo, Z. J., Miyoshi, H., Komyoji, T., Haga, T., & Fujita, T. (1991). Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2, 6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1056(1), 89–92.
- Hansen, T. E., & Johansen, T. (2011). Following autophagy step by step. *BMC biology*, 9, 1–4.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348–350.
- Hou, Y. P., Mao, X. W., Wu, L. Y., Wang, J. X., Mi, B., & Zhou, M. G. (2019). Impact of fluazinam on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 155, 81–89.
- Hrnčir, M., Jarau, S., & Barth, F. G. (2016). Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, 202, 597–601.
- Huang, M., Dong, J., Yang, S., Xiao, M., Guo, H., Zhang, J., & Wang, D. (2023). Ecotoxicological effects of common fungicides on the eastern honeybee *Apis cerana cerana* (Hymenoptera). *Science of The Total Environment*, 161637.
- 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: biological sciences*, 274(1608), 303–313.
- Kleinert, A. M., Ramalho, M., Cortopassi-Laurino, M., Ribeiro, M. D. F., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2009). *Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini)*.
- Kolanczyk, R. C., Serrano, J. A., Tapper, M. A., & Schmieder, P. K. (2018). A comparison of fish pesticide metabolic pathways with those of the rat and goat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 124–143.

- Lee, J. E., Kang, J. S., Shin, I. C., Lee, S. J., Hyun, D. H., Lee, K. S., & Koh, H. C. (2011). Fluazinam-induced apoptosis of SH-SY5Y cells is mediated by p53 and Bcl-2 family proteins. *Neurotoxicology*, 32(6), 702–710.
- Legard, D. E., Xiao, C. L., Mertely, J. C., & Chandler, C. K. (2001). Management of *Botrytis fruit* rot in annual winter strawberry using captan, thiram, and iprodione. *Plant Disease*, 85(1), 31–39.
- Li, T., Xiu, Q., Zhang, J., Wang, J. X., Duan, Y. B., & Zhou, M. G. (2020). Pharmacological characteristics and efficacy of fluazinam against *Corynespora cassiicola*, causing cucumber target spot in greenhouses. *Plant Disease*, 104(9), 2449–2454.
- Lima, M. A. P., Martins, G. F., Oliveira, E. E., & Guedes, R. N. C. (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*, 202(9), 733–747.
- Mao, X. W., Li, J. S., Chen, Y. L., Song, X. S., Duan, Y. B., Wang, J. X., Chen, C. J., Zhou, M. G., & Hou, Y. P. (2018). Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 27–35.
- Martins, G. F., Neves, C. A., Campos, L. A. O., & Serrão, J. E. (2006). The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2), 161–168.
- Michener, C. D. (2013). The meliponini. In *Pot-honey*. Springer, New York, NY, (pp. 3-17).
- Miotelo, L., Dos Reis, A. L. M., Rosa-Fontana, A., da Silva Pachú, J. K., Malaquias, J. B., Malaspina, O., & Roat, T. C. (2022). A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Chemosphere*, 288, 132461.
- Nicodemo, D., Mingatto, F. E., De Jong, D., Bizerra, P. F. V., Tavares, M. A., Bellini, W. C., Vicente, E. F., & de Carvalho, A. (2020). Mitochondrial respiratory inhibition promoted by Pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(6), 1267–1272.
- Oliveira, A. H., Gonçalves, W. G., Fernandes, K. M., Barcellos, M. S., Sampaio, W., Lopes, M. P., & Serrão, J. E. (2019). Morphology and Morphometry of the Midgut in the Stingless Bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). *Insects*, 10(3), 73.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922.

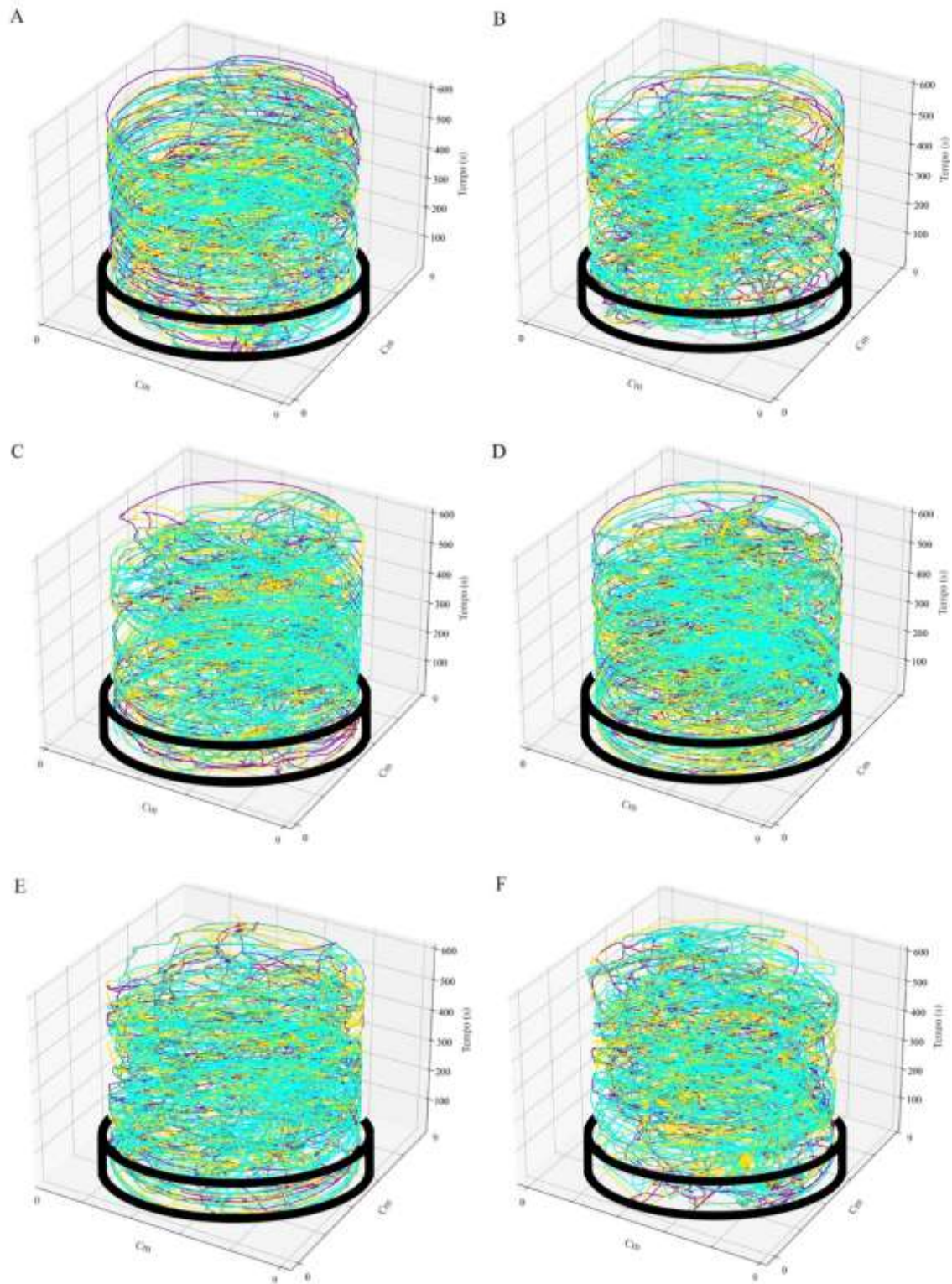
- Pedro, S. R. M. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 348–354.
- Pedro, SRM & Camargo, JMF (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 1–117.
- Räsänen, K., Mattila, T., Porvari, P., Kurppa, S., & Tiilikkala, K. (2015). Estimating the development of ecotoxicological pressure on water systems from pesticides in Finland 2000–2011. *Journal of Cleaner Production*, 89, 65–77.
- Roubik, D. W. (2014) Pollinator safety in agriculture. *Fiel manuals*.
- Sánchez-Bayo, F. & Wyckhuys, K. A. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological conservation*, 232, 8–27.
- Silva-Zacarin, E. C. (2007). Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy*, 3(5), 515–517.
- Shao, W., Zhang, Y., Ren, W., & Chen, C. (2015). Physiological and biochemical characteristics of laboratory induced mutants of *Botrytis cinerea* with resistance to fluazinam. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 117, 19–23.
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2017). A comprehensive review on the main honey authentication issues: Production and origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072–1100.
- Souders II, C. L., Wei, C., Schmidt, J. T., Da Fonte, D. F., Xing, L., Trudeau, V. L., & Martyniuk, C. J. (2021). Mitochondria of teleost radial glia: A novel target of neuroendocrine disruption by environmental chemicals?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 243, 108995.
- Souza, D. L. L., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2016). FMRFamide-cells in the midgut of *Scaptotrigona xanthotricha* (Apidae: Meliponini) of different ages and fed different diets. *Journal of Apicultural Research*, 55(5), 428–432.
- Stefanini, M. Demartino, C. and Zamboni, L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*. 216: 173–174.
- Syromyatnikov, M. Y., Kokina, A. V., Lopatin, A. V., Starkov, A. A., & Popov, V. N. (2017). Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee

- (*Bombus terrestris* L.). Pesticide biochemistry and physiology, v. 135, p. 41–46.
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), 2503–2518.
- Team, R. C. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Teixeira, A. D. D., Marques-Araújo, S., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2019). Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of apicultural research*, 58(3), 463–468.
- Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Corrêa, A. S., Gontijo, L. M., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. (2015). Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Annals of Applied Biology*, 167(2), 186–196.
- Van Engelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D. R., Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.
- Vitoratos, A. G. (2014). Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. *Journal of Phytopathology*, 162, 737–746.
- Wang, X. H., Zheng, S. S., Huang, T., Su, L. M., Zhao, Y. H., Souders II, C. L., & Martyniuk, C. J. (2018). Fluazinam impairs oxidative phosphorylation and induces hyper/hypo-activity in a dose specific manner in zebrafish larvae. *Chemosphere*, 210, 633–644.
- Werner, I., Schneeweiss, A., Segner, H., Junghans, M. (2021). Environmental risk of pesticides for fish in small-and medium-sized streams of Switzerland. *Toxics*, 9(4), 79.
- Wu, W., Kong, D., Zhang, W., Bu, Y., Li, J., & Shan, Z. (2020). Acute toxicity of fluazinam to aquatic organisms and its bioaccumulation in *Brachydanio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), 35000-35007.
- Zhang, X., Zhang, P., Perez-Rodriguez, V., Souders II, C. L., & Martyniuk, C. J. (2020). Assessing the toxicity of the benzamide fungicide zoxamide in zebrafish (*Danio rerio*): Towards an adverse outcome pathway for beta-tubulin inhibitors. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 78, 103405.
- Zheng, S., Wang, X., & Zhao, Y. (2018). The Toxic Effect of Fluazinam on Mitochondrial

Respiratory Function and Dopamine Neural System in Zebrafish Embryos. *Asian Journal of Ecotoxicology*, (4), 170–178.

Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PloS one*, 12(5), e0176837.

Apêndice 1. Faixas representativas em 3D do grupo controle 24h. (A, B e C) são abelhas da colônia 1 e (D, E e F) são abelhas da colônia 2. Foram registradas simultaneamente a atividade de caminhada de 10 minutos de quatro operárias forrageiras e analisadas mantendo a identidade individual com o software Ethoflow®. Cada cor indica uma identidade individual.



Apêndice 2. Faixas representativas em 3D do grupo controle e tratado com fluazinam durante 24h. Foram registradas simultaneamente a atividade de caminhada de 10 minutos de quatro forrageiras e analisadas mantendo a identidade individual com o software Ethoflow®. Cada cor indica uma identidade individual.

