

ALINE BEATRIZ REIS

**EFEITO DO ACARICICIDA CIFLUMETOFEM NO INTESTINO MÉDIO,
GLÂNDULA HIPOFARÍNGEA E CORPO GORDUROSO DE OPERÁRIAS DA
ABELHA *Apis mellifera***

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientador: Luis Carlos Martínez

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

R375e
2024
Reis, Aline Beatriz, 1993-
Efeito do acaricida ciflumetofem no intestino médio,
glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias da abelha
Apis mellifera / Aline Beatriz Reis. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (115 f): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.305>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Histologia. 2. Polinizadores. 3. Citotoxicidade
imunológica. 4. Intestinos - Efeito dos pesticidas.
5. Ultraestrutura (Biologia). 6. Ciflumetofem (Acaricida).
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

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

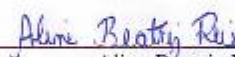
ALINE BEATRIZ REIS

**EFEITO DO ACARICIDA CIFLUMETOFEM NO INTESTINO MÉDIO, GLÂNDULA
HIPOFARÍNGEA E CORPO GORDUROSO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis
mellifera***

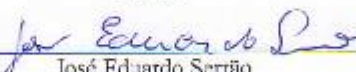
Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de março de 2024.

Assentimento:



Aline Beatriz Reis
Autora



José Eduardo Serrão
Orientador

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Meu mais profundo agradecimento a Deus. Sem ELE nada disso teria sido possível. Porque dele, por ele, para ele são todas as coisas e sem ele nada podemos fazer.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e por toda a estrutura fornecida.

Ao meu orientador, agradeço de forma especial por ter me ajudado durante todo o doutorado e por ser muito mais que um orientador, mas uma pessoa extremamente eficiente e competente, e sobretudo, sensato, empático, que entende que a vida não se resume apenas ao ambiente acadêmico. Muito obrigada por sua compreensão e eficiência!

A todos os meus colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular por toda ajuda e parceria. Muito obrigada! Vocês tornaram essa jornada mais leve!

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

À FAPEMIG (02367-18, 00856-19, 02486-22) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida! Meus mais sinceros agradecimentos.

*“Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas.
A ele seja a glória para sempre. Amém”.*

(Romanos 11:36)

RESUMO

Reis, Aline Beatriz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2024. **Efeito do acaricida ciflumetofem no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias da abelha *Apis mellifera*.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientador: Luis Carlos Martínez.

A abelha *Apis mellifera* é polinizadora de várias plantas e seus produtos são utilizados como alimento e na indústria farmacêutica. Nos últimos anos, tem ocorrido o declínio nas populações de abelhas, com causas multifatoriais, entre elas, a intensificação no uso de pesticidas na agricultura. Ciflumetofem é um pesticida utilizado em culturas de maçã, café e citros, que tem *A. mellifera* como principal polinizadora, sendo um potencial alvo desse químico, durante o forrageio. Este estudo avaliou se o ciflumetofem causa danos histopatológicos e citológicos no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera* expostas ao ciflumetofem. No capítulo 1, foram avaliados a toxicidade e os danos causados pelo pesticida após 24h, 48h e 72h de exposição. O ciflumetofem é tóxico para a abelha com CL_{50} de 2,54 g/L após 72h. O epitélio do intestino médio das abelhas tratadas apresentou vacuolização citoplasmática, liberação de vesículas e fragmentos celulares, indicativos de autofagia, detoxificação e morte celular, respectivamente. Análise ultraestrutural do intestino médio mostrou dilatação do labirinto basal e presença de esferocristais nas células digestivas, que indica maior transporte de substâncias entre a hemolinfa e o citosol das células e presença de substâncias tóxicas, respectivamente. As glândulas hipofaríngeas apresentaram maiores quantidades de secreção nas abelhas tratadas, sugerindo que ciflumetofem interfere na regulação secretora dessa glândula, enquanto o corpo gorduroso apresentou alterações na quantidade de proteínas nas abelhas expostas ao ciflumetofem por 24h e 72h. No capítulo 2, foram avaliados os efeitos de ciflumetofem nos mesmos órgãos de *A. mellifera*, com a concentração subletal: $CL_{9/100}$ (5 ppm) por 72h e 10 dias de exposição. O intestino médio das abelhas tratadas apresentou intensa vacuolização citoplasmática e fragmentação celular. As glândulas hipofaríngeas das abelhas tratadas apresentaram o aparato terminal cheio de secreção formando sáculos evidentes. O intestino médio teve índice de lesão significativo em 72h de exposição ao ciflumetofem, o qual regrediu após 10 dias, indicando possível recuperação do órgão. Nas glândulas hipofaríngeas os sáculos do aparato terminal estavam cheios de secreção, sugerindo que o pesticida interfere na regulação secretora dessa glândula. Em relação a citotoxicidade, no intestino médio, ocorreram células com protrusões apicais sem organelas em

seu interior, ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo, características de degeneração celular. Nas glândulas hipofaríngeas, as células secretoras apresentaram grânulos de secreção em todo o citoplasma, com possível indução a um forrageamento precoce. O corpo gorduroso apresentou alterações apenas nas quantidades de proteínas. No geral, os resultados revelam que ciflumetofem apresenta toxicidade para *A. mellifera* e gera danos nos órgãos, mesmo em concentração subletal, podendo comprometer as funções desses órgãos e afetar a manutenção e saúde de toda a colônia. Assim a classificação desse composto como sem efeitos ou com impacto limitado em artrópodes benéficos e inimigos naturais e com recomendação para uso no manejo integrado de pragas necessita ser reavaliado.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Histologia; Polinizador; Ultraestrutura.

ABSTRACT

Reis, Aline Beatriz, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, March, 2024. **Effect of the acaricide cyflumetofen on the midgut, hypopharyngeal glands, and fat body of the honeybee *Apis mellifera* workers.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-adviser: Luis Carlos Martínez.

The bee *Apis mellifera* is a pollinator of several plants and its products are used as food and in the pharmaceutical industry. In recent years, there has been a decline in bee populations, with multifactorial causes, including the intensification of the use of pesticides in agriculture. Ciflumetofem is a pesticide used in apple, coffee and citrus crops, which have *A. mellifera* as the main pollinator, being a potential target of this chemical during foraging. This study evaluated whether cyflumetofen causes histopathological and cytological damage in the midgut, hypopharyngeal gland and fat body of *A. mellifera* workers exposed to cyflumetofen. In chapter 1, the toxicity and damage caused by the pesticide were evaluated after 24h, 48h and 72h of exposure. Ciflumetofem is toxic to bees with an LC₅₀ of 2.54 g/L after 72 hours. The midgut epithelium of treated bees showed cytoplasmic vacuolization, release of vesicles and cell fragments, indicative of autophagy, detoxification and cell death, respectively. Ultrastructural analysis of the midgut showed dilation of the basal labyrinth and the presence of spherocrystals in the digestive cells, which indicates greater transport of substances between the hemolymph and the cytosol of the cells and the presence of toxic substances, respectively. The hypopharyngeal glands showed greater amounts of secretion in treated bees, suggesting that cyflumetofen interferes with the secretory regulation of this gland, while the fat body showed changes in the amount of proteins in bees exposed to cyflumetofen for 24h and 72h. In chapter 2, the effects of ciflumetofem on the same organs of *A. mellifera* were evaluated, with the sublethal concentration: LC_{9/100} (5 ppm) for 72 hours and 10 days of exposure. The midgut of treated bees showed intense cytoplasmic vacuolization and cellular fragmentation. The hypopharyngeal glands of treated bees showed the terminal apparatus full of secretion forming evident saccules. The midgut had a significant injury rate within 72 hours of exposure to cyflumetofen, which regressed after 10 days, indicating possible recovery of the organ. In the hypopharyngeal glands, the saccules of the terminal apparatus were full of secretion, suggesting that the pesticide interferes with the secretory regulation of this gland. Regarding cytotoxicity, in the midgut, there were cells with apical protrusions without organelles inside, rupture of the plasma membrane and leakage of contents, characteristics of cellular degeneration. In the hypopharyngeal glands, the secretory cells presented secretory granules throughout the

cytoplasm, possibly inducing early foraging. The fat body showed changes only in the amounts of proteins. Overall, the results reveal that cyflumetofen is toxic to *A. mellifera* and causes organ damage, even at sublethal concentrations, which can compromise the functions of these organs and affect the maintenance and health of the entire colony. Therefore, the classification of this compound as having no effects or having limited impact on beneficial arthropods and natural enemies and with a recommendation for use in integrated pest management needs to be reevaluated.

Keywords: Cytotoxicity; Histology; Pollinator; Ultrastructure.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1	32
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO 2	79
1. INTRODUÇÃO.....	81
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3. RESULTADOS	86
4. DISCUSSÃO	102
6. CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
CONCLUSÕES GERAIS	114

INTRODUÇÃO GERAL

Os Hymenoptera são uma das quatro maiores ordens de insetos, compreendendo mais de 153 mil espécies descritas, sendo composta por duas subordens, 27 superfamílias e 132 famílias, incluindo Apidae (Aguiar et al., 2013). Esses insetos têm importância econômica e desempenham um papel fundamental nos ecossistemas terrestres por serem predadores, parasitoides e polinizadores (Quicke, 1997; Grimaldi e Engel, 2005).

A família Apidae é diversa e inclui desde abelhas solitárias até aquelas altamente sociais (Silva et al., 2001; Neves e Viana, 2002). Em abelhas eussociais (abelhas melíferas e abelhas sem ferrão), a organização social dentro das colônias é baseada principalmente na diferenciação de castas, nas quais as fêmeas são especializadas em tarefas reprodutivas ou não reprodutivas (relacionadas ao cuidado da cria e manutenção da colônia) e no polietismo etário, pelo qual as operárias adultas desempenham diferentes tarefas ao longo da vida de acordo com a idade (Robinson e Vargo, 1997). Entre essas abelhas estão os Apini, representados pelo gênero *Apis* com nove espécies: *Apis florea* Fabricius (1787), *Apis andreniformis* Smith (1858), *Apis dorsata* Fabricius (1793), *Apis laboriosa* Smith (1871), *Apis mellifera* Linneaus (1758), *Apis cerana* Fabricius (1793), *Apis nuluensis* Tingek et al. (1996), *Apis nigrocincta* Smith (1861) e *Apis koschevnikovi* Enderlein (1906) (Bustamante et al., 2021).

A abelha *A. mellifera* é importante para a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas (Alonso-Prados et al., 2020) e de importância econômica, tanto pela produção e comercialização de seus produtos (mel, geleia real, própolis e cera) (Viuda-Martos et al., 2008; Cornara et al., 2017), quanto pelo seu papel na polinização de plantas cultivadas na agricultura (Gallai et al., 2009; Winfree et al., 2011, Hipólito et al., 2019; Borges et al., 2020).

Globalmente, o valor da polinização por insetos é estimado em mais de 200 bilhões de dólares, cerca de 9,5% do valor total da produção agrícola (vanEngelsdorp e Meixner, 2010),

sendo as abelhas os polinizadores mais importantes para a maioria das monoculturas em todo o mundo (McGregor, 1976; Delaplane e Mayer, 2000).

As colônias de *A. mellifera* são compostas por uma única rainha, cerca de 10-30 mil operárias e de zero a alguns milhares de machos dependendo da estação do ano (Page e Peng, 2001). Essa abelha possui sistema de determinação sexual haplodiploide, os ovos não fertilizados originam zangões (machos) e os fertilizados se desenvolvem em operárias ou rainhas, duas castas, onde a diferenciação morfo-fisiológica é determinada nutricionalmente durante a fase larval (Remolina e Hughes, 2008). As larvas diploides alimentadas com dieta rica de geleia real se desenvolvem em rainhas, enquanto aquelas alimentadas com uma dieta composta principalmente de outras secreções glandulares, mel e pólen se desenvolvem em operárias (Winston 1987).

A função da rainha é a produção de ovos e com isso a manutenção da população da colônia e a função dos machos é a fertilização da rainha durante o vôo nupcial. As operárias são as responsáveis pela maioria das funções para manutenção da colônia, apresentando uma divisão de trabalho, com base na idade, fenômeno conhecido como poliestismo etário, embora possa ser alterado de acordo com as necessidades da colônia (Michener, 1974).

Nas primeiras 2-3 semanas de vida, as operárias adultas realizam tarefas dentro da colônia como limpeza, manutenção e cuidados com as crias (Roberts e Elekonick, 2005; Amdam, 2011). Por volta da terceira semana de vida, as operárias passam a realizar tarefas fora da colônia, como o forrageio, que envolve a procura de água, néctar (carboidratos), pólen (proteína, lipídeos) ou material resinoso para produção de própolis (material antimicrobiano) (Seeley, 1982), por uma distância de até aproximadamente 14,4 km do ninho (Beekman e Ratnieks, 2000). Sendo essa atividade, uma das formas pela qual as abelhas podem ser contaminadas por compostos potencialmente tóxicos, que também podem ser acumulados na colônia (Magal et al., 2020; Alonso-Prados et al., 2021; Ohlinger et al., 2022).

Apesar de sua importância, o declínio nas populações de muitas espécies de abelhas é um problema mundial que afeta a apicultura, ecossistemas naturais e a agricultura (Aizen et al., 2019; Castilhos et al., 2019; Powney et al., 2019; Zattara e Aizen, 2021). As causas mais prováveis para esse fenômeno global, incluem infecções por patógenos e parasitas, poluição ambiental, fragmentação e perda de habitat naturais, monoculturas, mudanças climáticas e intensificação no uso de pe (vanEngelsdorp et al., 2009; Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; Grab et al., 2019; Guimarães-Cestaro et al., 2020; Gregorc, 2020; Grant et al., 2021).

Devido ao declínio em suas populações, estudos têm sido realizados para aumentar o conhecimento sobre as abelhas e como elas têm sido afetadas (Nielsen et al., 2017; Castilhos et al., 2019), principalmente testando os efeitos de pesticidas em *A. mellifera* (Li et al., 2022; Liu et al., 2022; Carneiro et al., 2022, 2023; Cang et al., 2023; Souza et al., 2023). Estes estudos têm mostrado que apesar das abelhas não serem os insetos alvos dos pesticidas, elas podem sofrer não só com os efeitos letais, mas também com os subletais desses compostos, que podem afetar a fisiologia, o comportamento e a longevidade dos indivíduos, bem como a saúde de toda a colônia.

Dentre os pesticidas, ciflumetofem é um pesticida de benzoil acetonitrila desenvolvido pela Otsuka AgriTechno Co., Ltd. (Sun et al., 2016) utilizado para o controle de uma variedade de ácaros pragas em plantações de maçã, nozes, pepino, tomate, chás e plantas ornamentais (Takahashi et al., 2012; Chen et al., 2013). No Brasil, esse pesticida é comercializado com os nomes Okay e Obny, sendo indicado para combater o ácaro-da-leprose *Brevipalpus phoenicis* em citros e café, o ácaro-vermelho *Oligonychus ilicis* em café e o ácaro-vermelho-europeu *Panonychus ulmi* em maçãs, culturas que são polinizadas por abelhas.

Este pesticida inibe o complexo mitocondrial II em ácaros ligando-se ao sítio Q do complexo succinato desidrogenase, bloqueando fisicamente o acesso à ubiquinona (Sierotzki e Scalliet, 2013). Com isso, a cadeia transportadora de elétrons é bloqueada, afetando assim a

produção de energia (ATP) nas células e levando a morte dos ácaros. É considerado sem efeitos ou com impacto limitado em artrópodes benéficos e inimigos naturais, sendo, portanto, recomendado para uso no manejo integrado de pragas (Takahashi et al., 2012). Entretanto, resíduos de ciflumetofem permanecem no meio ambiente, com seus metabólitos frequentemente liberados em quantidade maiores do que seu composto original, sendo um potencial contaminante (Li et al., 2012; 2013). Contudo, não há dados sobre os efeitos desse pesticida em órgãos de *A. mellifera*, que poliniza as culturas de maçã, café e citros e podem ser expostas a esse pesticida durante o forrageio, tanto ao encontrarem recursos contaminados como néctar, pólen e água (Oldroyd, 2007), como também por contato quando as abelhas pousam em plantas tratadas ou durante a pulverização de culturas (Gradish et al., 2019; Sgolastra et al., 2019). Sendo assim, é importante entender como *A. mellifera* pode ser afetada por ciflumetofem, principalmente aqueles órgãos envolvidos nos processos de detoxificação, crescimento da colônia e com importantes funções no metabolismo do inseto, como o intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso.

Nas abelhas, o trato digestório é dividido em intestinos anterior, médio e posterior (Snodgrass, 1956). O intestino médio é o local mais importante para a digestão e absorção de nutrientes (Cruz-Landim, 2009), mas com função também na detoxificação de químicos ingeridos (Kiljanek et al., 2016), sendo o principal local de entrada de inseticidas (Denecke et al., 2018). O intestino médio é formado por um epitélio simples com células digestivas colunares responsáveis pela absorção de nutrientes e síntese de enzimas digestivas e componentes da matriz peritrófica (Serrão e Cruz-Landim, 1995, 1996; Marques-Silva et al., 2005). Além das células digestivas, o epitélio do intestino médio é formado por células endócrinas isoladas que produzem hormônios (Neves et al., 2003) e por células regenerativas, responsáveis por substituir as células que morrem (Martins et al., 2006; Fernandes et al., 2010).

A matriz peritrófica, produzida pelas células do intestino médio, é composta por quitina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteínas (Liu et al., 2012; Jariyapan et al., 2013; Moussian, 2013). Essa matriz é multifuncional: participa da absorção de nutrientes, representa a primeira barreira contra patógenos (Oliveira et al., 2022) e toxinas ingeridas durante a alimentação (Jariyapan et al., 2013; Silva et al., 2016; Teixeira et al., 2019; Chen et al., 2021), sendo capaz de inativar as toxinas ingeridas (Summers e Felton, 1996) e previne danos mecânicos às células intestinais (Lehane, 1997; Martin et al., 2006).

As glândulas hipofaríngeas ocorrem apenas nos Hymenoptera e possuem graus variados de desenvolvimento (Arthidoro de Castro et al., 2020). São estruturas pareadas localizadas bilateralmente na cabeça, na frente do cérebro, entre os olhos compostos (Cruz-Landim e Costa, 1998). As unidades secretoras dessas glândulas são globulares e compostas por ácinos uni- ou multicelulares que liberam suas secreções em um canal axial (Knecht e Kaatz, 1990; Deseyn e Billen, 2005). Cada célula secretora apresenta um núcleo central e um túbulo membranoso que o serpenteia, chamado de aparato terminal (Richter et al., 2016). Em *A. mellifera*, a secreção dessas glândulas é a geleia real, principal fonte de alimento para as larvas e produzida e fornecida por operárias jovens (Hrassnigg e Crailsheim, 1998), desempenhando um papel essencial na dieta e diferenciação de castas (Michener, 1974). As abelhas operárias mais novas produzem geleia real e alimentam as larvas, mas à medida que se transformam em forrageiras, o tamanho das glândulas hipofaríngeas diminui (Britto et al., 2004) e a secreção de proteínas é alterada passando a incluir enzimas como alfa-glicosidade, glicose oxidase e amilase (Ohashi et al., 1999). Essa alteração no tamanho da glândula hipofaríngea e na produção de enzimas é normal e faz parte do desenvolvimento das abelhas. Contudo, diminuição na atividade dessa glândula, fora dessa mudança de função, de operária para forrageira, afeta a produção de geleia real, prejudica o crescimento da colônia (Heylen et al., 2011), tanto pela quantidade, como pela qualidade da geleia real produzida que será ofertada para as larvas em desenvolvimento e para

as rainhas, onde pode afetar a produção de ovos. Sendo assim, alterações anormais na produção de secreção nas glândulas hipofaríngeas é considerado um indicador de falha no desenvolvimento e fisiologia das abelhas devido a exposição a pesticidas (Škerl e Gregorc, 2010).

O corpo gorduroso é um órgão que se distribui por todo o corpo do inseto (Roma et al., 2010), com importantes funções no metabolismo (Nilsen et al., 2011; Wang et al., 2012), sendo um dos órgãos mais importantes para os processos de manutenção das funções fisiológicas e reprodução (Roma et al., 2010). Este órgão armazena e libera energia em resposta às demandas do inseto (Arrese e Soulages, 2010) e apresenta atividade biossintética (Law e Wells, 1989) das proteínas da hemolinfa e metabólitos circulantes (Arrese e Soulages, 2010), e na produção de vitelogenina, proteína com importante papel na reprodução dos insetos (Roma et al., 2010; Brejcha et al., 2023). Além disso, produz vários peptídeos antimicrobianos (Ferrandon et al., 2007) e participa da desintoxicação do metabolismo do nitrogênio (Law e Wells, 1989) e detoxificação de xenobióticos (Domingues et al., 2017). Também é um órgão alvo para a ação de todos os principais hormônios dos insetos, como os hormônios neurais, juvenil e ecdisona (Keeley, 1985).

Os níveis de nutrientes acumulados no corpo gorduroso modulam vários aspectos importantes da vida do inseto, como a taxa de crescimento, o momento da metamorfose e a produção de ovos (Mirth e Riddiford, 2007). O corpo gorduroso também faz parte do sistema imune, pois os lipídeos armazenados são mobilizados para a hemolinfa em resposta a um desafio imunológico (Dettloff et al., 2001; Cheon et al., 2006). Assim, este órgão é um indicador biológico potencial do estado dos indivíduos durante a vida de uma colônia (Toth e Robinson, 2005).

Nas abelhas adultas, o estado do corpo gorduroso muda de acordo com o período do ciclo de vida e função desse inseto (Keller et al., 2005; Toth e Robinson, 2005; Chobotow e

Strachecka, 2013). O corpo gorduroso é formado pelos trofócitos e urócitos, podendo ter enócitos associados. Os trofócitos (origem mesodérmica), são as células mais numerosas responsáveis pelo armazenamento e secreção de nutrientes e detoxificação (Wójcik et al., 2022). Os urócitos, estão presentes nas larvas e adultos recém-emergidos (Cruz-Landim 2000; Paes-de-Oliveira e Cruz-Landim 2003) onde substituem os túbulos de Malpighi, na fase larval, durante a metamorfose e armazenam sais de urato reduzindo a concentração de produtos tóxicos na hemolinfa (Snodgrass 1935; Costa-Leonardo et al., 2013, Furtado et al., 2013). Os enócitos, por sua vez, tem origem ectodérmica, sendo o segundo tipo celular em abundância no corpo gorduroso, responsáveis pela síntese de carboidratos (Skowronek et al., 2021) e lipídeos da cutícula do exoesqueleto (Chapman et al., 2013) e participação na síntese do hormônio ecdisteróide (Romer et al., 1974; Chiang et al., 2016).

Apesar das importantes funções desses órgãos para um inseto polinizador de extrema importância para os ecossistemas e agricultura, poucos estudos tem avaliado os efeitos de ciflumetofem em *A. mellifera* e em outros insetos não-alvo desse pesticida. Mas todos os estudos já realizados obtiveram como resultado alterações tais como: mortalidade, alterações comportamentais (efeito subletal) (Leite et al., 2021) e inibição mitocondrial (Hayashi et al., 2013).

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar se ciflumetofem apresenta toxicidade para *A. mellifera*. Para tanto foi analisado se a exposição oral das abelhas a concentrações letal e subletal de ciflumetofem causam alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, A. P., Deans, A. R., Engel, M. S., Forshage, M., Huber, J. T., Jennings, J. T., Johnson, N. F., Lelej, A. S., Longino, J. T., Lohrmann, V., Mikó, I., Ohl, M., Rasmussen, C., Taeger, A., Yu, D. S. K. (2013). Order Hymenoptera. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013). *Zootaxa* 3703, 51-62.
- Aizen, M. A., Aguiar, S., Biesmeijer, J. C., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W., Jung, C., Martins, D.J., Medel, R., Morales, C.L., Ngo, H., Pauw, A., Paxton, R.J., Saéz, A., Seymour, C. L. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* 25, 3516-3527.
- Alonso-Prados, E., Muñoz, I., De la Rúa, P., Serrano, J., Fernández-Alba, A. R., García-Valcárcel, A. I., Hernando, M.D., Alonso, A., Alonso-Prados, J.L., Bartolomé, C., Maside, X., Barrios, L., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2020). The toxic unit approach as a risk indicator in honey bee surveillance programmes: A case of study in *Apis mellifera iberiensis*. *Science of The Total Environment* 698, 134208.
- Alonso-Prados, E., González-Porto, A. V., Bernal, J. L., Bernal, J., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2021). A case report of chronic stress in honey bee colonies induced by pathogens and acaricide residues. *Pathogens* 10, 955.
- Amdam, G. V. (2011). Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* 10(1), 18-27.
- Arrese, E. L., Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55, 207-225.
- Arthidoro de 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.

- Beekman, M., Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology* 14, 490-496.
- Borges, R. C., Brito, R. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Giannini, T. C. (2020). The value of crop production and pollination services in the Eastern Amazon. *Neotropical Entomology* 49, 545-556.
- Brejcha, M., Prušáková, D., Sábová, M., Peska, V., Černý, J., Kodrík, D., Konopová, B., Frydrychová, R. Č. (2023). Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. *Journal of Insect Physiology* 104504.
- Britto, F. B., Caetano, F. H., and de Moraes, R. L. (2004). Comparative analysis of morphological, structural and morphometric patterns of *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) hypopharyngeal glands. *Neotropical Entomology* 33, 321–326.
- Bustamante, T., Fuchs, S., Grünewald, B., Ellis, J. D. (2021). A geometric morphometric method and web application for identifying honey bee species (*Apis* spp.) using only forewings. *Apidologie* 52, 697-706.
- Cang, T., Lou, Y., Zhu, Y. C., Li, W., Weng, H., Lv, L., Wang, Y. (2023). Mixture toxicities of tetrachlorantraniliprole and tebuconazole to honey bees (*Apis mellifera* L.) and the potential mechanism. *Environment International* 107764.
- 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., Medeiros-Santana, L., 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.

- 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., Motta, J. V. O., Nere, P. H. A., Oliveira, A. H., 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.
- 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.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology* 8, 1e20.
- Chapman, R. F., Simpson, S. J., Douglas, A. E. (2013). *The Insects Structure and Function*, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, X., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, J., Li, Y., Li, M., Wang, Y., Zheng, Y. (2013). Chiral determination of a novel acaricide cyflumetofen enantiomers in cucumber, tomato, and apple by HPLC. *Journal of Separation Science* 36, 225-231.
- Chen, C., Chen, H., Huang, S., Jiang, T., Wang, C., Tao, Z., He, C., Tang, Q., Li, P. (2021). Volatile DMNT directly protects plants against *Plutella xylostella* by disrupting the peritrophic matrix barrier in insect midgut. *Elife* 10, e63938.
- Cheon, H. M., Shin, S. W., Bian, G., Park, J. H., Raikhel, A. S. (2006). Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biology Chemistry* 281, 8426–35.
- Chiang, Y. N., Tan, K. J., Chung, H., Lavrynenko, O., Shevchenko, A., Yew, J. Y. (2016). Steroid hormone signaling is essential for pheromone production and oenocyte survival. *PLoS Genetics* 12, e1006126.
- Chobotow, J., Strachecka, A. (2013). Morphology and function of insect fat bodies taking into account *Apis mellifera* L. honey bees. *Medycyna Weterynaryjna* 69, 712-715.

- Cruz-Landim, C. D., Costa, R. A. C. (1998). Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. *Journal of Computational Biology* 3, 151-63.
- Cruz-Landim, C. D. (2000). Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genetics and Molecular Biology* 23, 83-88.
- Cruz-Landim C. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. SciELO-Ed, São Paulo.
- Delaplane, K. S., Mayer, D. F. (2000). *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing, New York.
- 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.
- Deseyn, J., Billen, J. (2005). Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36, 49-57.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C., Wiesner, A. (2001). Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell and Tissue Research* 306, 449–58.
- 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.
- Fernandes, K. M., Araujo, V. A., Serrão, J. E., Martins, G. F., Campos, L. A. O., Neves, C. A. (2010). Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthioides* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 56, 489–505.

- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 7, 862-874.
- Furtado, W. C. A., Azevedo, D. O., Martins, G. F., Zancunico, 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, 1502-1510.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 810-821.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957.
- Grab, H., Branstetter, M. G., Amon, N., Urban-Mead, K. R., Park, M. G., Gibbs, J., Blitzer, E. J., Poveda, K., Loeb, G., Danforth, B. N. (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363, 282–284.
- Gradish, A. E., Van Der Steen, J., Scott-Dupree, C. D., Cabrera, A. R., Cutler, G. C., Goulson, D., Klein, O., Lehmann, D. M., Lückmann, J., O’Neill, B., Raine, N. E., Sharma, B., Thompson, H. (2019). Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology* 48, 12-21.
- Grant, K. J., DeVetter, L., Melathopoulos, A. (2021). Honey bee (*Apis mellifera*) colony strength and its effects on pollination and yield in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*). *PeerJ* 9, e11634.
- Gregorc, A. (2020). Monitoring of honey bee colony losses: A special issue. *Diversity* 12, 403.
- Grimaldi, D.A., Engel, M.S. (2005). *Evolution of the Insects* (Cambridge University Press).

- Guimarães-Cestaro, L., Martins, M.F., Martínez, L.C., Alves, M. L. T. M. F., Guidugli-Lazzarini, K. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Serrão, J. E., Teixeira, É. W. (2020). Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *The Science of Nature* 107, 1-14.
- Hayashi, N., Sasama, Y., Takahashi, N., & Ikemi, N. (2013). Cyflumetofen, a novel acaricide—its mode of action and selectivity. *Pest Management Science* 69, 1080-1084.
- Heylen, K., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R., Billen, J. (2011). The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 42, 103-116.
- Hipólito, J., Sousa, B. D. S. B., Borges, R. C., de Brito, R. M., Jaffé, R., Dias, S., Fonseca, V. L. I., Giannini, T. C. (2019). Valuing nature's contribution to people: The pollination services provided by two protected areas in Brazil. *Global Ecology and Conservation* 20, e00782.
- Grassnigg, N., Crailsheim, K. (1998). Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology* 44, 929-939.
- Jariyapan, N., Saeung, A., Intakhan, N., Chanmol, W., Sor-Suwan, S., Phattanawiboon, B., Taai, K., Choochote, W. (2013). Peritrophic matrix formation and *Brugia malayi* microfilaria invasion of the midgut of a susceptible vector, *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 112, 2431-2440.
- Keller, I., Fluri, P., Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees: part 1. *Bee World* 86, 3-10.
- Keeley, L. L. (1985). Physiology and biochemistry of the fat body. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 211e248, v. 3.

- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Posyniak, A. (2016). Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science* 60, 5.
- Knecht, D., Kaatz, H. H. (1990). Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* 21,457–468.
- Law, J. H., Wells, M. A. (1989). Insects as biochemical models. *Journal of Biological Chemistry* 264, 16335–38.
- Lehane, M. J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42, 525–550.
- Leite, D. T., Sampaio, R. B., Chambó, E. D., Aguiar, C. M. L., de Godoy, M. S., de Carvalho, C. A. L. (2022). Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science* 42, 435-443.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Qin, D., Zheng, Y. (2012). Determination of cyflumetofen residue in water, soil, and fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35, 2743–2749.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Li, Y., Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1300, 95-103.
- Li, Z., Yang, H., Yu, L., Liu, C., Wu, X. (2022). The negative effect of flumethrin stress on honey bee (*Apis mellifera*) worker from larvae to adults. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 188, 105289.

- Liu, X., Zhang, H., Li, S., Zhu, K.Y., Ma, E., Zhang, J. (2012). Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 902–910.
- Liu, C., Wu, X., Yang, H., Yu, L., Zhang, Y. (2022). Effects of larval exposure to the insecticide flumethrin on the development of honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Frontiers in Physiology* 13, 2644.
- Magal, P., Webb, G. F., Wu, Y. (2020). A spatial model of honey bee colony collapses due to pesticide contamination of foraging bees. *Journal of Mathematical Biology* 80, 2363-2393.
- 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, 23–30.
- Martin, G. G., Simcox, R., Nguyen, A., Chilingaryan, A. (2006) Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability. *Biological Bulletin* 211, 275–285.
- 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, 161–168.
- McGregor, S. E. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. US Department of Agriculture, Washington, DC.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press.
- Mirth, C.K., Riddiford, L.M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays* 29, 344–55
- Moussian, B. (2013). The apical plasma membrane of chitin-synthesizing epithelia. *Insect Science* 20, 139-146.

- Neves, E. L. D., Viana, B. F. (2002). As abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) visitantes florais em um ecossistema de dunas continentais no médio Rio São Francisco, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 46, 571-578.
- Neves, C. A., Gitirana, L. B., Serrão, J. E. (2003). Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology* 63, 683-690.
- Nilsen, K. A., Ihle, K. E., Frederick, K., Fondrk, M. K., Smedal, B., Hartfelder, K., Amdam, G. V. (2011). Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *Journal of Experimental Biology* 214, 1488-1497.
- Nielsen, A., Reitan, T., Rinvoll, A. W., Brysting, A. K. (2017). Effects of competition and climate on a crop pollinator community. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 246, 253-260.
- Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* 265, 127–133.
- Ohlinger, B. D., Schürch, R., Durzi, S., Kietzman, P. M., Silliman, M. R., Couvillon, M. J. (2022). Honey bees (Hymenoptera: Apidae) decrease foraging but not recruitment after neonicotinoid exposure. *Journal of Insect Science* 22, 16.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biology* 5, e168.
- Oliveira, A. H., Souza, A. M. C., Resende, M. T. C. S., Carneiro, L. S., Oliveira, J. F., Serra, R. S., Serrão, J. E. (2022). The peritrophic matrix delays *Nosema ceranae* infection in the honey bee *Apis mellifera* midgut. *Physiological Entomology*, 1–7.

- Paes de Oliveira, V. T., Cruz-Landim, C. (2003). Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Sociobiology* 701-709.
- Page Jr, R. E., Peng, C. Y. S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36, 695-711.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 345-353.
- Powney, G. D., Carvell, C., Edwards, M., Morris, R. K., Roy, H. E., Woodcock, B. A., Isaac, N. J. (2019). Widespread losses of pollinating insects in Britain. *Nature Communications* 10, 1018.
- Quicke, D. L. J. (1997). *Parasitic Wasps* (Chapman & Hall).
- Remolina, S. C., Hughes, K. A. (2008). Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age* 30, 177-185.
- Richter, K. N., Rolke, D., Blenau, W., Baumann, O. (2016). Secretory cells in honeybee hypopharyngeal gland: polarized organization and age-dependent dynamics of plasma membrane. *Cell and tissue research*, 366, 163-174.
- Roberts, S. P., Elekonich, M. M. (2005). Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology* 208, 4193-4198.
- Robinson, G. E., Vargo, E. L. (1997). Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35, 559-583.
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron* 41, 395-401.

- Romer, F., Emmerich, H., Nowock, J. (1974). Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. *Journal of Insect Physiology* 20, 1975-1987.
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11, 287-293.
- 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., Cruz-Landim, C. (1996). Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 88, 161–171.
- Sgolastra, F., Hinarejos, S., Pitts-Singer, T. L., Boyle, N. K., Joseph, T., Lückmann, J., Raine, N.E., Singh, R., Williams, N.M., Bosch, J. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environmental Entomology* 48, 22-35.
- Sierotzki, H., Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103, 880-887.
- Silva, F. B., Viana, B. F., Neves, E. L. (2001). Biology and Architecture of *Centris* (Hemisiella) *tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Centridini) Nests. *Neotropical Entomology* 30, 541-545.
- Silva, F. W. S., Araujo, L. S., Azevedo, D. O., Serrão, J. E., Elliot, S. L. (2016). Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiological Entomology* 41, 121–126.
- Škerl, M. I. S., Gregorc, A. (2010). Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* 41, 73-86.

- Skowronek, P., Wójcik, Ł., Strachecka, A. (2021). Fat body—Multifunctional insect tissue. *Insects* 12, 547.
- Snodgrass, R. E. (1935). *Principles of Insect Morphology* McGraw Hill Book Co. Inc. New York. p, 510-549.
- Snodgrass, R. E. (1956). *Anatomy and physiology of the honeybees*. Comstock Publishing Associates, New York, NY.
- Souza, C. O., Wanderley Teixeira, V., Cruz, G. D. S., Guedes, C. A., Nascimento, J. C. D. S., Cavalcanti Lapa Neto, C. J., Teixeira, Á. A. C. (2023). Toxicology, histophysiological and nutritional changes in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submitted to limonene and natural pesticides in comparison to synthetic pesticides. *Journal of Apicultural Research* 1-12.
- Summers, C. B., Felton, G. W. (1996). Peritrophic envelope as a functional antioxidant. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* 32, 131-142.
- Sun, D., Pang, J., Zhou, Z., Jiao, B. (2016). Enantioselective environmental behavior and cytotoxicity of chiral acaricide cyflumetofen. *Chemosphere* 161, 167-173.
- Takahashi, N., Nakagawa, H., Sasama, Y., Ikemi, N. (2012). Development of a new acaricide, cyflumetofen. *Journal of Pesticide Science* J12-03.
- Teixeira, A. 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, 463–468.
- Toth, A. L., Robinson, G. E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal behaviour* 69, 427-435.

- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R., Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4, e6481.
- vanEngelsdorp, D., Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S80-S95.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-Lopez, J., Pérez-Alvarez, J. A., (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* 73, R117-R124.
- Wang, Y., Brent, C. S., Fennern, E., Amdam, G. V. (2012). Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. *PLoS Genet* 8, e1002779.
- Winfrey, R., Gross, B. J., Kremen, C. (2011). Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics* 71, 80-88.
- Winston, M. L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Wójcik, Ł., Chęć, M., Skowronek, P., Grabowski, M., Persona, K., Strachecka, A. (2022). Do the different life history strategies of ants and honeybees determine fat body morphology? *Arthropod Structure & Development* 69, 101186.
- Zattara, E. E., Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114-123.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE CONCENTRAÇÃO LETAL DE CIFLUMETOFEM NO INTESTINO MÉDIO, GLÂNDULA HIPOFARÍNGEA E CORPO GORDUROSO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)

RESUMO

A abelha *Apis mellifera* é importante para a manutenção dos ecossistemas, polinização de culturas e para a economia, tanto pelo seu papel como polinizadora como por seus produtos comercializáveis. Nos últimos anos, tem sido relatado o declínio nas populações de abelhas, com causas multifatoriais, entre elas, a intensificação no uso de pesticidas na agricultura. Dentre esses pesticidas, ciflumetofem é um pesticida utilizado em culturas de maçã, café e citros, que tem *A. mellifera* como principal polinizadora, sendo um potencial alvo desse químico, durante o forrageio. Este estudo avaliou danos histopatológicos e citológicos no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera* expostas à CL₅₀ de ciflumetofem. O epitélio do intestino médio das abelhas tratadas apresentou vacuolização citoplasmática, liberação de vesículas e fragmentos celulares, indicativos de autofagia, detoxificação e morte celular. Análise ultraestrutural do intestino médio mostrou dilatação do labirinto basal e presença de esferocristais nas células digestivas. As glândulas hipofaríngeas apresentaram maiores quantidades de secreção nas abelhas tratadas, enquanto o corpo gorduroso não apresentou alterações. Os resultados indicam que a exposição aguda de *A. mellifera* ao ciflumetofem afeta negativamente essa abelha, gerando danos no intestino médio e alterações na glândula hipofaríngea que podem comprometer a sobrevivência desse polinizador.

1. INTRODUÇÃO

A abelha *Apis mellifera* é importante para a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas (Alonso-Prados et al., 2020) e de grande importância econômica, tanto pela produção e comercialização de seus produtos (mel, geleia real, própolis e cera) (Viuda-Martos et al., 2008; Cornara et al., 2017), quanto pelo seu papel na polinização de plantas cultivadas na agricultura (Gallai et al., 2009; Winfree et al., 2011, Hipólito et al., 2019; Borges et al., 2020). Globalmente, o valor da polinização por insetos é estimado em mais de US\$ 200 bilhões, cerca de 9,5% do valor total da produção agrícola (vanEngelsdorp e Meixner, 2010), sendo as abelhas, os polinizadores mais importantes para a maioria das culturas em todo o mundo (McGregor, 1976; Delaplane e Mayer, 2000).

Apesar de sua importância, o declínio nas populações de muitas espécies de abelhas é um problema mundial que afeta a apicultura, ecossistemas naturais e a agricultura (Aizen et al., 2019; Castilhos et al., 2019; Powney et al., 2019; Zattara e Aizen, 2021). As causas mais prováveis para esse fenômeno global, incluem infecções por patógenos e parasitas, poluição ambiental, fragmentação e perda de habitat naturais, monoculturas, mudanças climáticas, manejo incorreto e intensificação no uso de pesticidas (vanEngelsdorp et al., 2009; Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; Grab et al., 2019; Guimarães-Cestaro et al., 2020; Gregorc, 2020; Grant et al., 2021).

Dentre os pesticidas, ciflumetofem é um pesticida de benzoil acetonitrila (Sun et al., 2016) utilizado para o controle de uma variedade de ácaros pragas em plantações de maçã, nozes, pepino, tomate, chás e plantas ornamentais (Takahashi et al., 2012; Chen et al., 2013). No Brasil, esse pesticida é indicado para combater o ácaro-da-leprose *Brevipalpus phoenicis* em citros e café, o ácaro-vermelho *Oligonychus ilicis* em café e o ácaro-vermelho-europeu *Panonychus ulmi* em maçãs, culturas que são polinizadas por abelhas.

O ciflumetofem inibe o complexo mitocondrial II em ácaros ligando-se ao sítio Q do complexo succinato desidrogenase, bloqueando o acesso à ubiquinona (Sierotzki e Scalliet, 2013). Com isso, a cadeia transportadora de elétrons é bloqueada, afetando assim a produção de energia (ATP) nas células e levando a morte dos ácaros. É considerado sem efeitos ou com impacto limitado em artrópodes benéficos e inimigos naturais, sendo recomendado para uso no manejo integrado de pragas (Takahashi et al., 2012). Entretanto, resíduos de ciflumetofem permanecem no ambiente e seus metabólitos frequentemente são liberados em quantidade maiores que o composto original, sendo um potencial contaminante ambiental (Li et al., 2012; 2013). Contudo, não há dados sobre os efeitos desse pesticida em órgãos de *A. mellifera*, que poliniza as culturas de maçã, café e citros e podem ser expostas a esse pesticida pelo consumo de recursos contaminados como néctar, pólen e água (Oldroyd, 2007), como por contato, quando as abelhas pousam em plantas tratadas ou durante a pulverização de culturas (Gradish et al., 2019; Sgolastra et al., 2019). Assim, é importante entender como *A. mellifera* pode ser afetada por ciflumetofem, principalmente aqueles órgãos envolvidos nos processos de detoxificação, crescimento da colônia e no metabolismo do inseto, incluindo o intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso.

Nas abelhas, o intestino médio é o órgão de digestão e absorção de nutrientes (Cruz-Landim, 2009) e detoxificação de químicos ingeridos (Kiljanek et al., 2016), sendo o principal local de entrada de inseticidas (Denecke et al., 2018). As glândulas hipofaríngeas em abelhas operárias adultas de *A. mellifera*, é o local da síntese de componentes da geleia real, principal fonte de alimento para as larvas e rainha (Hrassnigg e Crailsheim, 1998), desempenhando papel essencial na dieta e diferenciação de castas (Michener, 1974). Diminuição na atividade dessa glândula e, portanto, na produção de geleia real, prejudica o crescimento da colônia (Heylen et al., 2011). Sendo assim, alterações anormais na produção de secreção das glândulas

hipofaríngeas é considerado um indicador de falha no desenvolvimento e fisiologia das abelhas devido a exposição a pesticidas (Škerl e Gregorc, 2010).

O corpo gorduroso é um dos órgãos mais importantes para os processos de manutenção das funções fisiológicas e reprodução nos insetos (Roma et al., 2010), participa na detoxificação de xenobióticos (Domingues et al., 2017), na defesa imune (Dettloff et al., 2001; Cheon et al., 2006) e é um órgão alvo para a ação dos principais hormônios dos insetos, como os hormônios neurais, juvenil e ecdisona (Keeley, 1985). Além disso, os níveis de nutrientes acumulados no corpo gorduroso modulam vários aspectos importantes da vida do inseto, como a taxa de crescimento, a metamorfose e a produção de ovos (Mirth e Riddiford, 2007). Assim, este órgão é um indicador biológico potencial da saúde das abelhas (Toth e Robinson, 2005).

Neste sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar se a exposição oral aguda ao ciflumetofem é tóxica e causa danos histopatológicos e citotóxicos no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias adultas de *A. mellifera*, contribuindo com novos dados sobre os efeitos desse pesticida nesse polinizador.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Abelhas

Quadros de cria contendo pupas de *A. mellifera* foram coletados de três colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O) e mantidos a 31 ± 2 ° C por 24h. As operárias adultas recém-emergidas foram coletadas e utilizadas para os experimentos.

2.2. Teste de toxicidade

As abelhas recém-emergidas foram mantidas em potes plásticos de 250 mL, com 10 abelhas por pote. Durante os três primeiros dias, as abelhas foram mantidas com água, mel e pólen *ad libitum* (Williams et al., 2013). No terceiro dia, o alimento foi substituído por solução de sacarose a 50% com as concentrações de ciflumetofem (Okay® SC 200 g de ingrediente

ativo/L, Sugai Chemical Industry CP., LTD., Sukai, Japão) a 25 g/L; 12,5 g/L; 6,25 g/L, 3,12 g/L, 1,56 g/L e 0,78 g/L. Como controle foi usado solução aquosa de sacarose 50% (m/v). O experimento foi realizado em triplicata, com 10 abelhas com três dias de vida por pote plástico (250 mL), totalizando 30 abelhas por concentração de ciflumetofem e o controle. Em cada pote plástico, o alimento foi ofertado, *ad libitum*, em um microtubo de 1,5 mL perfurado (Williams et al., 2013). O número de abelhas mortas foi contado a cada 24h por 72h de exposição ao ciflumetofem e no controle. O teste de toxicidade foi adaptado a partir das diretrizes da OCDE nº 213 (OCDE, 1998) e Williams et al. (2013).

2.3. Exposição

As abelhas recém-emergidas (<24h de vida adulta) foram alimentadas por 24h, 48h e 72h com a CL₅₀ de ciflumetofem estimada a partir do teste de toxicidade diluído em sacarose 50%. As abelhas do controle receberam apenas a solução de sacarose a 50% sem ciflumetofem. Cada grupo de abelha foi composto por 10 indivíduos mantidos em frascos de plástico de 250 mL conforme descrito acima. Os testes foram realizados em triplicata.

2.4. Microscopia de luz

Cinco operárias para cada tempo de exposição (24h, 48h e 72h), tratadas com CL₅₀ de ciflumetofem e controle, foram imobilizadas a 4 °C por 3 minutos e transferidas para solução salina para insetos (0,1 M NaCl+0,2 M KH₂PO₄+0,2 M Na₂HPO₄) e os intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso dissecados e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12h a 5 °C. A seguir as amostras foram desidratadas em gradiente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Alemanha) conforme instruções do fabricante. Secções com 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão).

2.5. Índice de lesão no intestino médio

Dentre as amostras de intestino médio obtidas para microscopia de luz, foram selecionadas cinco secções aleatoriamente para avaliar o índice de lesão de órgãos causado pelo ciflumetofem após exposição oral, de acordo com Bernet et al. (1999) e Grella et al. (2019). A soma de todas as alterações histológicas em cada intestino médio foi calculada por abelha (totalizando 5 abelhas por tempo de exposição) com a equação $I_{org} = \sum a \times w$, onde $\sum a$ é a soma das alterações, a é o valor da pontuação e w é o fator de importância (Bernet et al., 1999). As pontuações foram classificadas como: i) nenhuma ocorrência = 0, ii) ocorrência leve = 1, iii) ocorrência moderada = 2 ou iv) ocorrência grave = 3. As importâncias dos fatores foram classificadas como: i) dano reversível = 1 (fragmentos de células eliminados, secreção apócrina), ii) dano geralmente reversível = 2 (vacuolização celular), e iii) dano irreversível = 3 (núcleo picnótico, dano em células regenerativas) (Grella et al., 2019).

2.6. Histoquímica

Algumas secções histológicas não coradas foram submetidas aos testes histoquímicos a seguir.

2.6.1. Detecção e quantificação de proteínas

As secções histológicas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de cinco operárias *A. mellifera* por tratamento e controle, foram incubadas em mercúrio bromofenol (100 mL de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bromofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio) por 2 h e 15 min. Em seguida foram lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas com meio de montagem Entellan e lamínulas de 24 x 60 mm, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX53. Para cada abelha foram obtidas imagens de cinco secções aleatórias do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso, que foram utilizadas para quantificação de proteínas de acordo com a intensidade de reação pelo mercúrio de bromofenol utilizando o software ImageJ/FIJI. A intensidade da reação positiva para mercúrio de bromofenol foi medida através da análise da intensidade dos

valores de cinza das imagens (Urstadt, 2022). As imagens tiveram seus valores de pixel convertidos da escala de cores RGB (red-vermelho, green-verde, blue-azul) para escala de cinza. Áreas de 32 x 32 pixels para intestino médio e corpo gorduroso, e de 100 x 100 pixels para glândula hipofaríngea foram utilizadas nas análises.

2.6.2. Detecção e quantificação de polissacarídeos neutros e glicoconjugados

As secções histológicas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *A. mellifera* foram submetidas ao teste de ácido periódico-Schiff (PAS). As amostras foram incubadas em ácido periódico 0,4% por 30 min, lavadas rapidamente em água destilada e transferidas para reativo de Schiff (Lillie, 1965) por 1 h no escuro. Então, foram lavadas em água corrente por 30 min, montadas, analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX60. As imagens obtidas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de cada abelha (n= 5) foram utilizadas para quantificação de carboidratos de acordo com a intensidade de coloração de PAS utilizando o software ImageJ/FIJI. A intensidade da reação positiva para PAS foi medida através da análise da intensidade dos valores de cinza das imagens (Urstadt, 2022) conforme descrito acima.

2.6.3. Quantificação de lipídeos

As imagens obtidas dos trofócitos presentes no corpo gorduroso (corados com mercúrio de bromofenol) foram utilizadas para quantificação de lipídeos. Cinco secções aleatórias por abelha (n = 5) foram analisadas com o programa GIMP versão 2.10 (<https://www.gimp.org/>), com o auxílio da ferramenta de seleção por cor (Solomon, 2009). A área preenchida por lipídeos, caracterizada pela ausência de reação positiva foi quantificada em número de pixels.

2.7. Citotoxicidade

Cinco abelhas do grupo controle e cinco abelhas alimentadas com CL₅₀ de cilmfetofem foram dissecadas. O intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso foram transferidos para solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio

0,2 M, pH 7,2 e 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e embebidas em resina LR Wite (London Resin Company Ltd.). Secções ultrafinas (60-90 nm de espessura) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrotomo Sorvall MT2-BMT2-B (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.8. Estatística

Os dados de mortalidade das abelhas, obtidos no teste de toxicidade, foram submetidos a análise Probit com o programa SAS para Windows v. 9.3. (SAS Institute, 2002). Para o índice de lesão no intestino médio, a soma de todas as alterações histológicas, em cada intestino por abelha, foi analisada com teste t-Student usando o programa GraphPadPrism v.7.0.

Os dados de intensidade dos valores de cinza das imagens, utilizados para quantificação de proteínas e carboidratos, e os valores de pixels, utilizados para a quantificação de lipídeos, foram submetidos ao teste t-Student com software R versão 4.2.2 (R Core Team, 2020) e os pacotes stats e ggplot2 (Wickham, 2016).

Todas as análises foram realizadas com 5% de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Teste de toxicidade

O modelo de concentração-mortalidade usado foi adequado ($p > 0,05$), confirmando a toxicidade de ciflumetofem para *A. mellifera* e permitindo parâmetros toxicológicos para determinar as $CL_{25} = 1,14$ g/L, $CL_{50} = 2,54$ g/L, $CL_{75} = 5,63$ g/L e $CL_{90} = 11,53$ g/L (Tabela 1). A mortalidade no grupo controle foi menor que 1%.

Tabela 1. Concentração letal de ciflumetofem em *Apis mellifera* após 72 horas de exposição (Probit, $gl = 5$, inclinação $\pm ep = 1,949 \pm 0.25$, intercepto = 1,788).

Nº de insetos	Concentração letal	Concentração estimada (g/L)	95% intervalo de confiança (g/L)	χ^2 (p-valor)
30	CL ₂₅	1,14	0,78 - 1,51	7,25 (0,12)
30	CL ₅₀	2,54	1,96 - 3,32	
30	CL ₇₅	5,63	4,19 - 8,54	
30	CL ₉₀	11,53	7,75 - 21,45	

3.2. Histopatologia

3.2.1. Intestino médio

No controle, o epitélio do intestino médio das abelhas é formado por uma única camada de células colunares com núcleos elípticos ricos em cromatina descondensada, citoplasma com presença de pequenos vacúolos, superfície apical mostrando borda estriada bem desenvolvida e na porção basal ocorrem ninhos de células regenerativas (Fig. 1A).

No intestino médio das abelhas tratadas com a CL₅₀ de ciflumetofem, ocorreram danos histopatológicos em todos os tempos de exposição. Após 24h de exposição, foi observada a presença de muitos vacúolos citoplasmáticos nas células digestivas, condensação da cromatina nuclear, fragmentação celular e presença de matriz peritrófica (Fig. 1B). Após 48h, houve liberação de vesículas caracterizada pela presença de protruções na superfície apical (Fig. 1C), intensa vacuolização citoplasmática nas células digestivas e liberação de fragmentos celulares para o lúmen (Fig. 1D). Em 72h de exposição ao ciflumetofem, foi observada a liberação de fragmentos celulares (Fig. 1E) e muitos vacúolos no citoplasma (Fig. 1F).

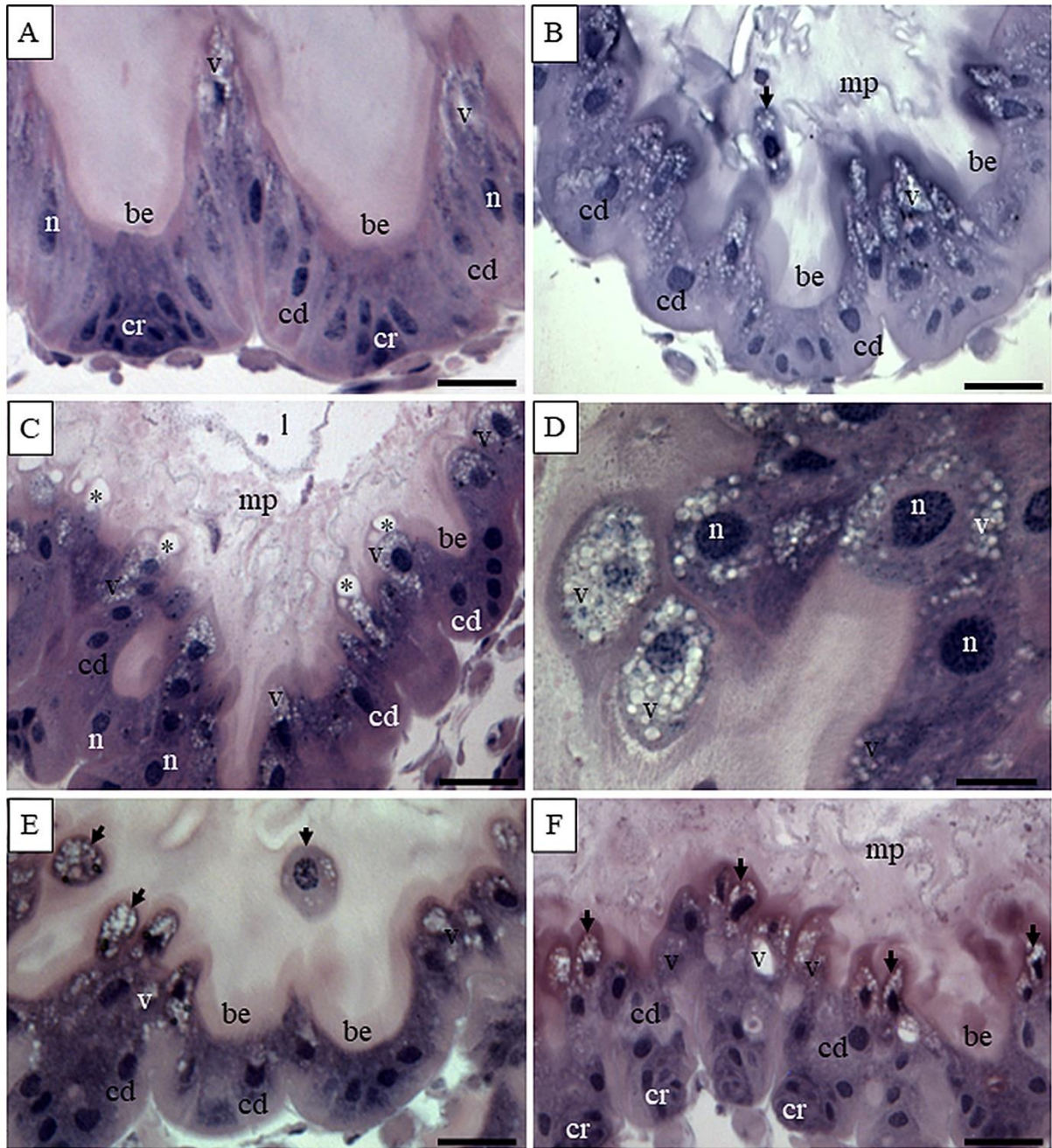


Figura 1. Micrografias de luz do intestino médio de *Apis mellifera*. A) Epitélio de abelha controle com uma única camada de células digestivas colunares (cd) com núcleos (n) ricos em cromatina descondensada, borda estriada (be) bem desenvolvida, ninhos de células regenerativas (cr) na porção basal e presença de alguns pequenos vacúolos (v). B) Epitélio de abelha exposta ao ciflumetofem por 24h mostrando a presença de muitos vacúolos (v) no citoplasma das células digestivas (cd), fragmentos celulares (seta) e matriz peritrófica (mp). C, D) Epitélio de abelha exposta ao ciflumetofem por 48h mostrando vacúolos nas células digestivas e liberação de vesículas (asterisco). Em D, evidenciamos a intensa vacuolização citoplasmática e condensação da cromatina nuclear. E, F) Epitélio intestinal de abelha exposta ao ciflumetofem por 72h mostrando vacúolos no citoplasma e vários fragmentos das células digestivas com borda estriada e membrana peritrófica. Barra de escala: 10 μ m.

O índice de lesão no intestino médio (Fig. 2) foi similar entre as abelhas controle e tratadas com a CL₅₀ do inseticida por 24h ($t_{1,8} = 1,36$; $p = 0,2106$; Fig. 2A) e 72h ($t_{1,8} = 0,23$; $p = 0,8220$; Fig. 2C). Entretanto, após 48h de exposição ao ciflumetofem, ocorreu aumento no índice de lesão do intestino médio ($t_{1,8} = 4,27$; $p < 0,0027$; Fig. 2B).

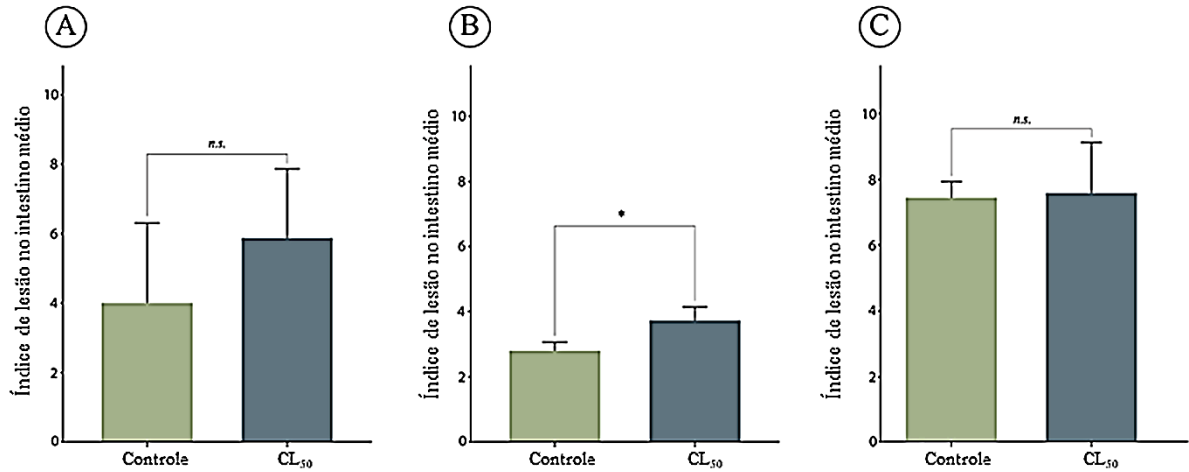


Figura 2. Índice de lesão no intestino médio de *Apis mellifera* exposta à CL₅₀ de ciflumetofem por 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Asterisco indica diferença estatística entre o tratamento e o controle, n.s. indica ausência de diferença estatística.

3.2.2. Glândula hipofaríngea

As glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* são formadas por várias unidades globulares (ácinos) compostas por várias células secretoras com núcleo bem desenvolvido rico em cromatina descondensada e um aparato terminal que preenche praticamente todo o espaço dentro de cada uma das células secretoras (Figs. 3A-B e 4A-C). Não foram encontradas diferenças histopatológicas nos ácinos das glândulas hipofaríngeas entre as abelhas do controle (Fig. 3) e as tratadas com a CL₅₀ de ciflumetofem nos diferentes tempos de exposição (Fig. 4A-C).

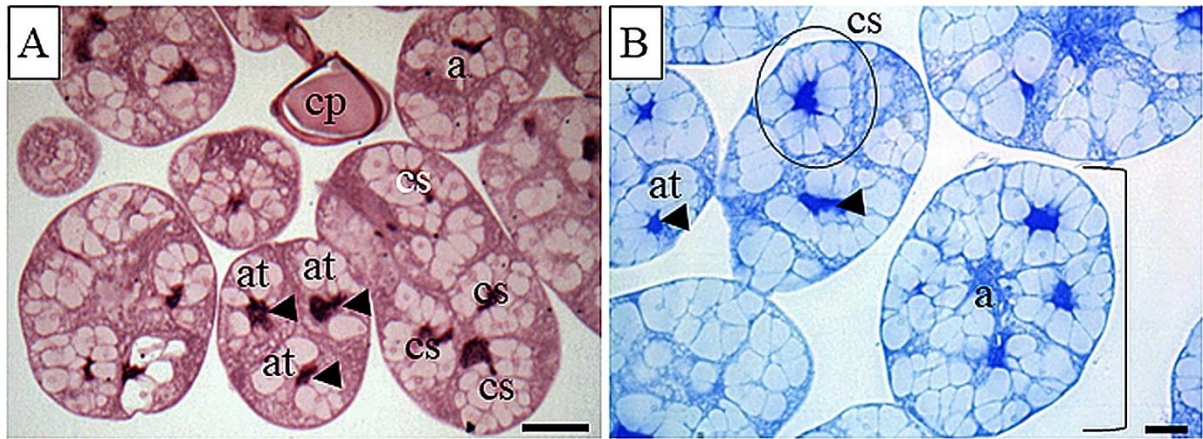


Figura 3. Micrografias de luz de glândula hipofaríngea de *Apis mellifera*. Controle. A, B) Ácinos (a) formados por células secretoras (cs) com núcleo (cabeça de seta) e citoplasma com aparato terminal (at). Coloração: A) Hematoxilina e eosina. B) Mercúrio de bromofenol. cp: canal principal. Barra de escala: 20 µm.

3.2.3. Corpo gorduroso

O corpo gorduroso é formado pelos trofócitos, células globulares preenchidas por gotículas lipídicas que possuem núcleos irregulares bem desenvolvidos com cromatina descondensada e vários nucléolos, e também pelos enócitos, que possuem forma elipsoide com limites bem definidos e núcleo esférico centralizado com vários nucléolos e pequenos vacúolos em seu citoplasma (Fig. 5A-D). As abelhas tratadas com a CL₅₀ de ciflumetofem nos diferentes tempos de exposição (Fig. 5B-D) não apresentaram mudanças histopatológicas no corpo gorduroso em relação ao controle (Fig. 5A).

3.3. Histoquímica

O teste histoquímico para detecção de proteínas (mercúrio de bromofenol) foi positivo no intestino médio (Fig. 6A-D), glândula hipofaríngea (Fig. 3B) e corpo gorduroso (Fig. 5A-D) de *A. mellifera*, tanto nas abelhas controle, como nas tratadas.

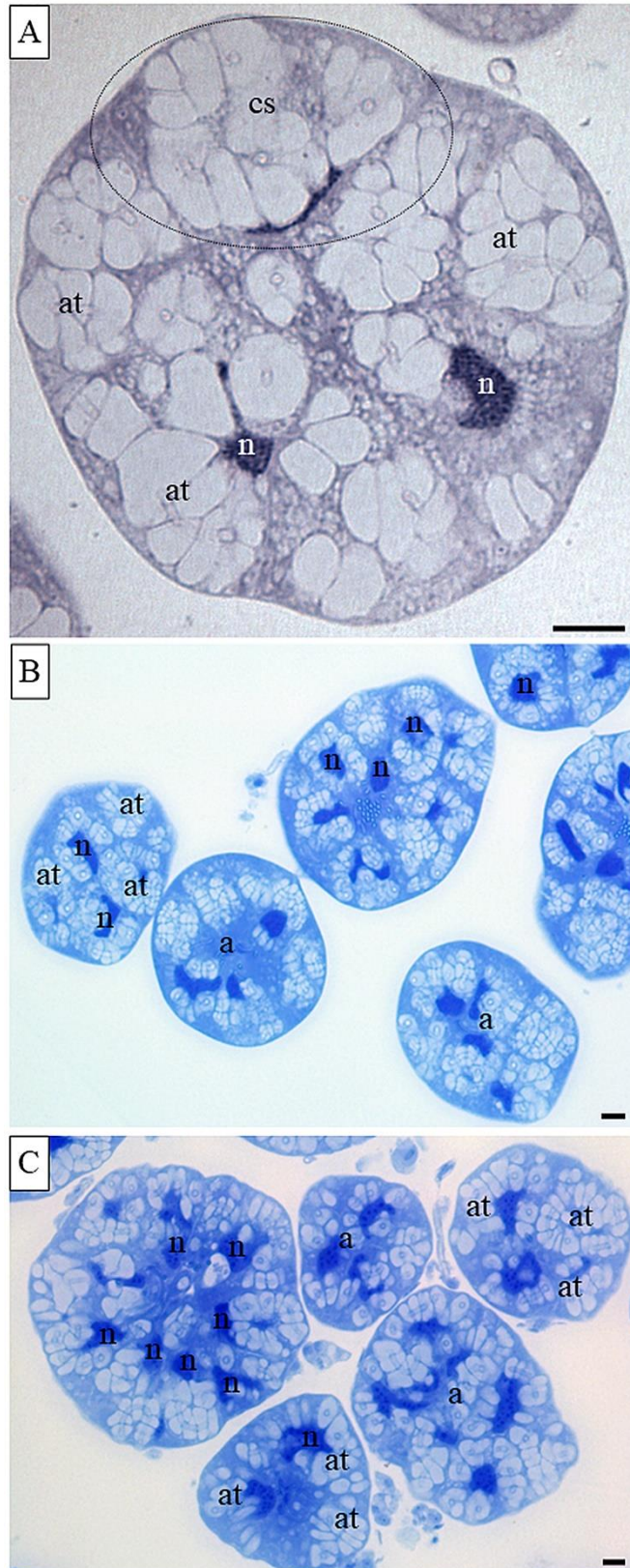


Figura 4. Glândula hipofaríngea de abelhas alimentadas com CL₅₀ de ciflumetofem: A) 24h; B) 48h; C) 72h. A) Ácino secretor, destacando uma célula secretora (cs), núcleo (n) de cada célula secretora e aparato terminal (at). B, C) Vários ácinos secretores. Coloração: A) Hematoxilina e eosina; B, C) Bromofenol mercúrio. Barra de escala: 10 µm.

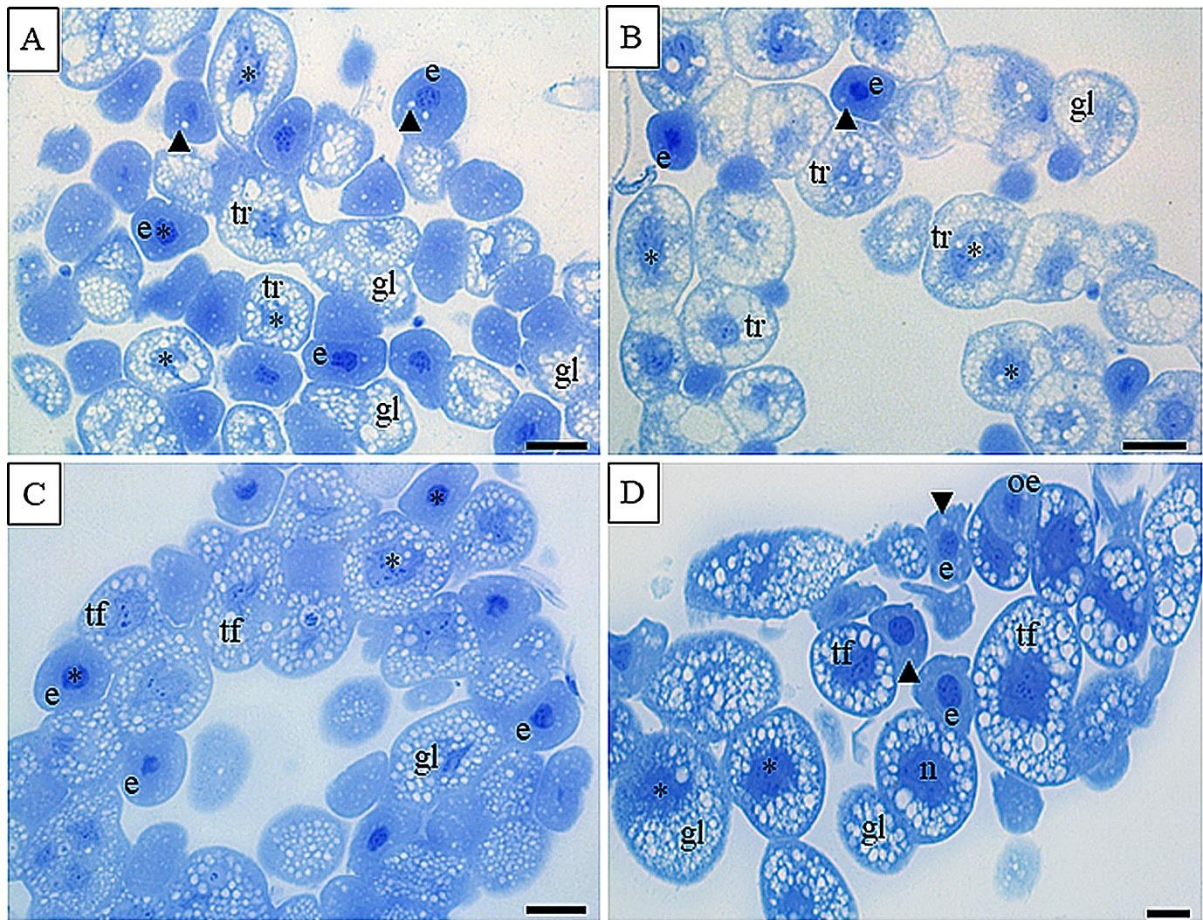


Figura 5. Micrografias de luz do corpo gorduroso de *Apis mellifera* mostrando os trofócitos (tf) com formato variável preenchido por gotículas lipídicas (gl), núcleos ramificados (*) com vários nucléolos e os enócitos (e) com formato elipsoide, com limites bem definidos, núcleo esférico centralizado (*) com vários nucléolos e presença de pequenos vacúolos no citoplasma (cabeças de setas). A) Controle. Tratamento com ciflumetofem CL₅₀: B) 24h; C) 48h; D) 72h. Coloração: mercúrio de bromofenol. Barra de escala: 20 µm.

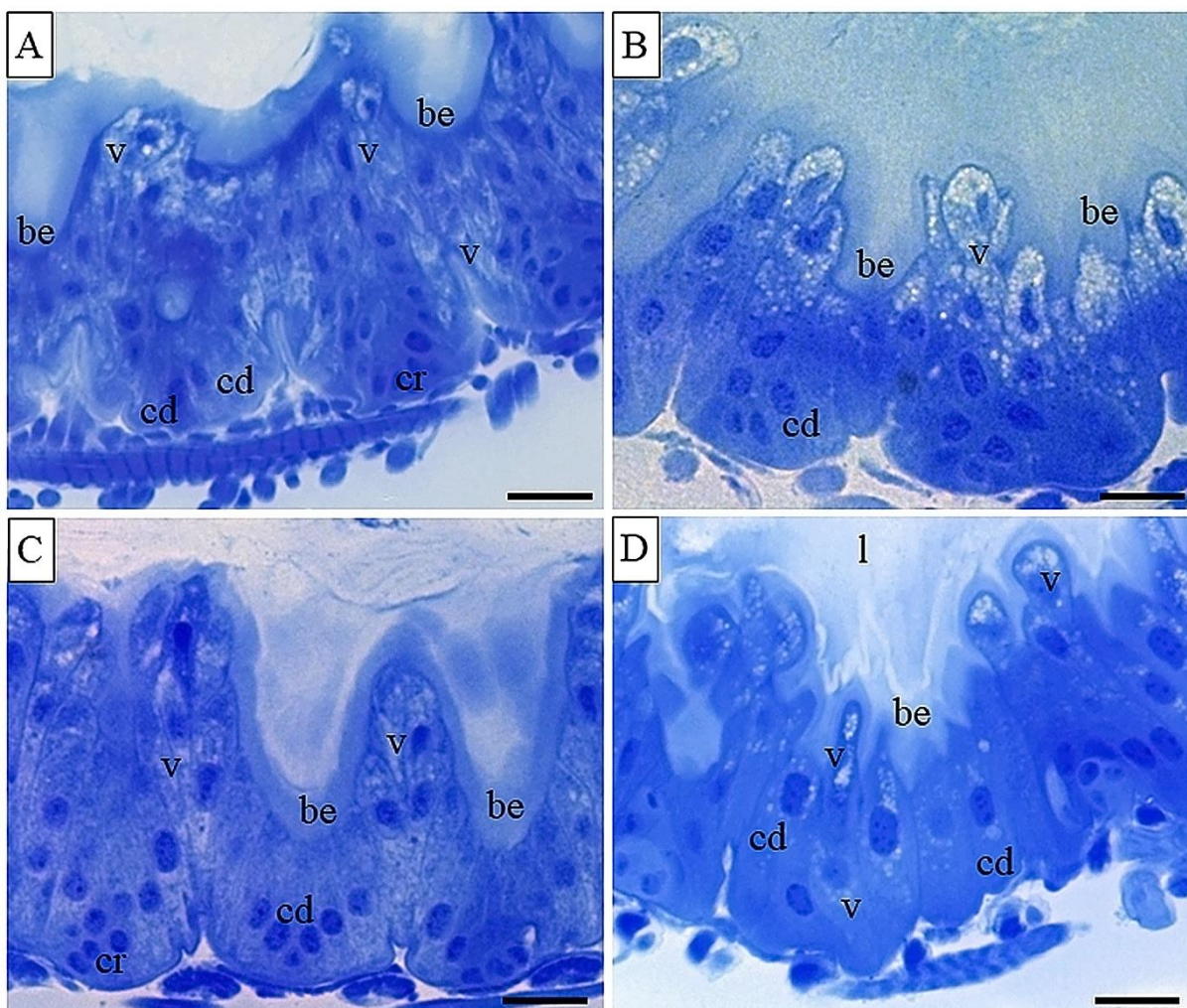


Figura 6. Micrografias de luz do intestino médio de *Apis mellifera*, positivas para proteínas utilizando mercúrio de bromofenol. A) Controle. Tratamentos com ciflumetofem CL₅₀: B) 24h, (C) 48h, D) 72h. Intestino médio mostrando lúmen (l), epitélio formado por células digestivas (cd) colunares, borda em escova (be) bem desenvolvida e presença de vacúolos (v) no citoplasma. Barra de escala: 20 µm.

A intensidade da reação de mercúrio de bromofenol no intestino médio de *A. mellifera* foi similar entre o controle e as abelhas tratadas por 24h ($t_{1,4} = 2,37$; $p = 0,07$) e 72h com ciflumetofem ($t_{1,4} = 1,15$; $p = 0,31$), mas houve maior intensidade de reação naquelas expostas por 48h ($t_{1,4} = 4,12$; $p < 0,01$) (Fig. 7).

Nas glândulas hipofaríngeas, a intensidade da reação de mercúrio de bromofenol foi similar entre o controle e todos os tratamentos com ciflumetofem por 24h ($t_{1,4} = 2,15$; $p = 0,09$), 48h ($t_{1,4} = 0,21$; $p = 0,82$) e 72h ($t_{1,4} = 0,36$; $p = 0,73$) (Fig. 8).

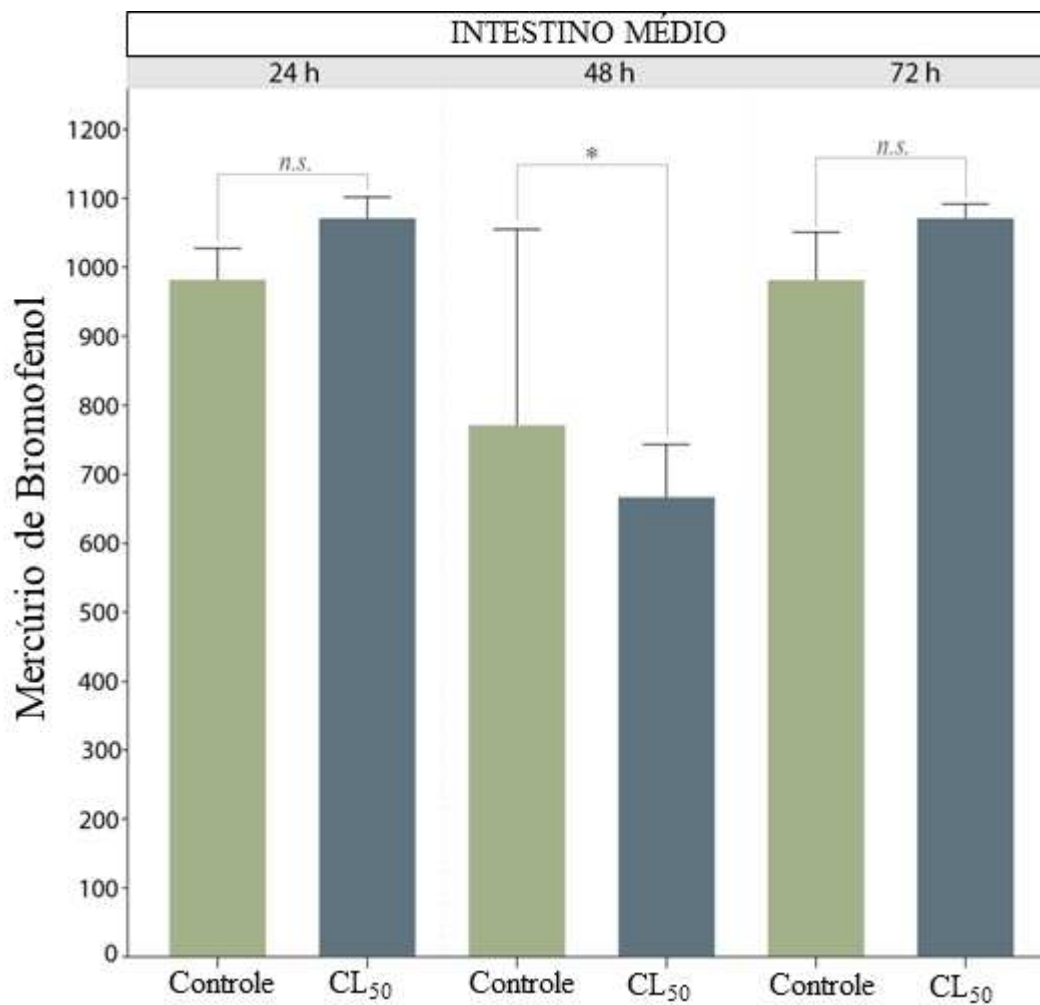


Figura 7. Intensidade da reação positiva pela técnica histoquímica de mercúrio de bromofenol no intestino médio de *Apis mellifera* em 24h, 48h e 72h de exposição ao ciflumetofem e respectivos controles. Asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) e n.s. indica ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

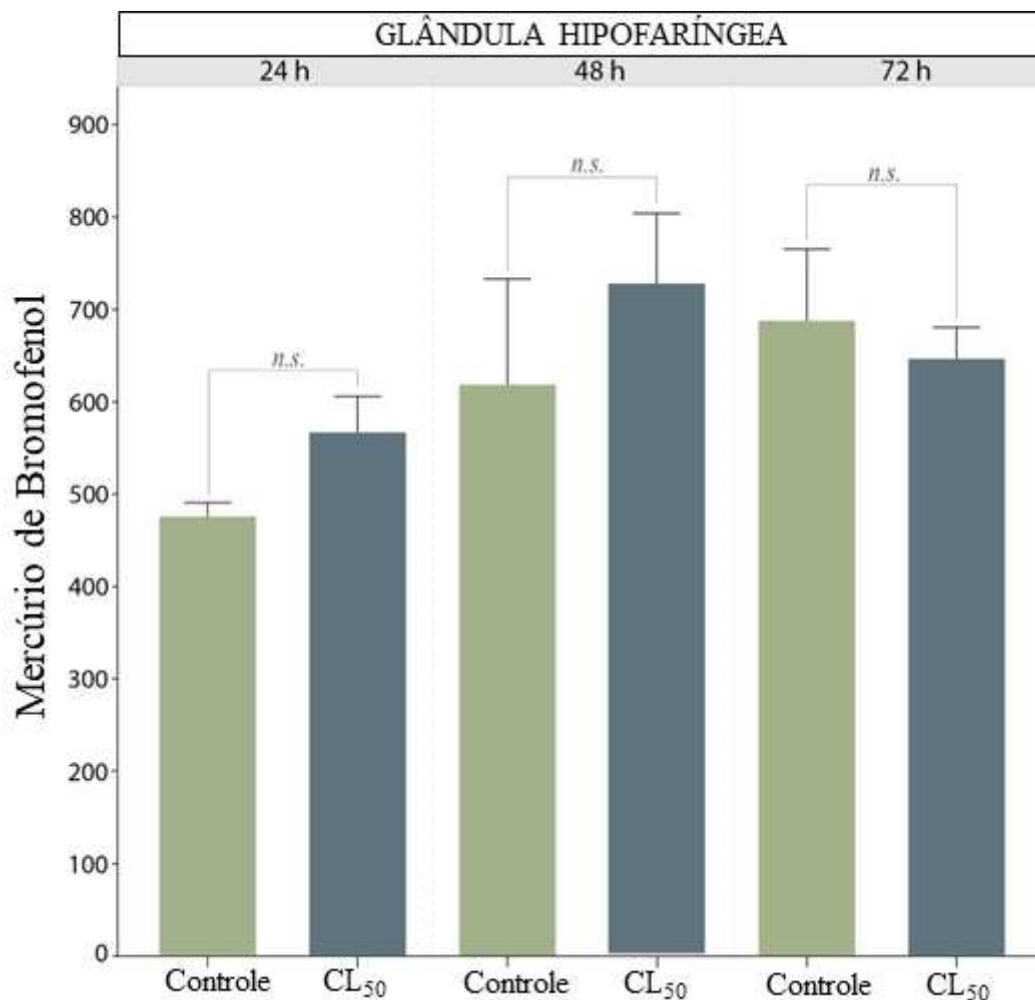
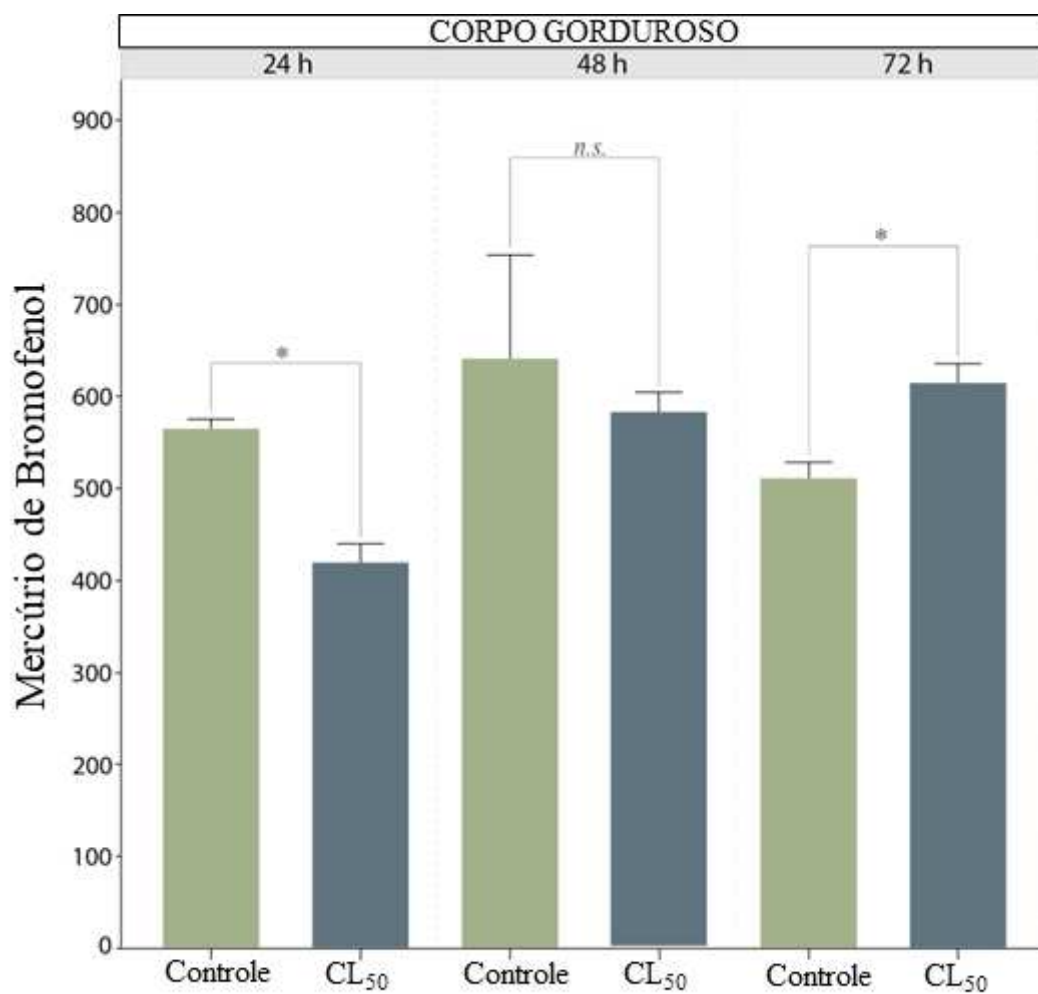


Figura 8. Intensidade da reação positiva pela técnica histoquímica de mercúrio de bromofenol na glândula hipofaríngea de *Apis mellifera* em 24h, 48h e 72h após exposição ao ciflumetofem e respectivos controles. n.s. indica ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

No corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera* tratadas com ciflumetofem por 24h ($t_{1,4} = 6,16$; $p < 0,003$) houve menor intensidade de reação ao mercúrio de bromofenol que no controle, sendo as médias entre controle e tratamento similares em 48h ($t_{1,4} = 0,49$; $p = 0,64$) e maior nas abelhas tratadas por 72h ($t_{1,4} = 3,86$; $p < 0,01$) (Fig. 9).



O teste histoquímico para detecção de carboidratos (PAS) foi positivo no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *A. mellifera*, tanto nas abelhas do controle, como nas tratadas com ciflumetofem (Fig. 10).

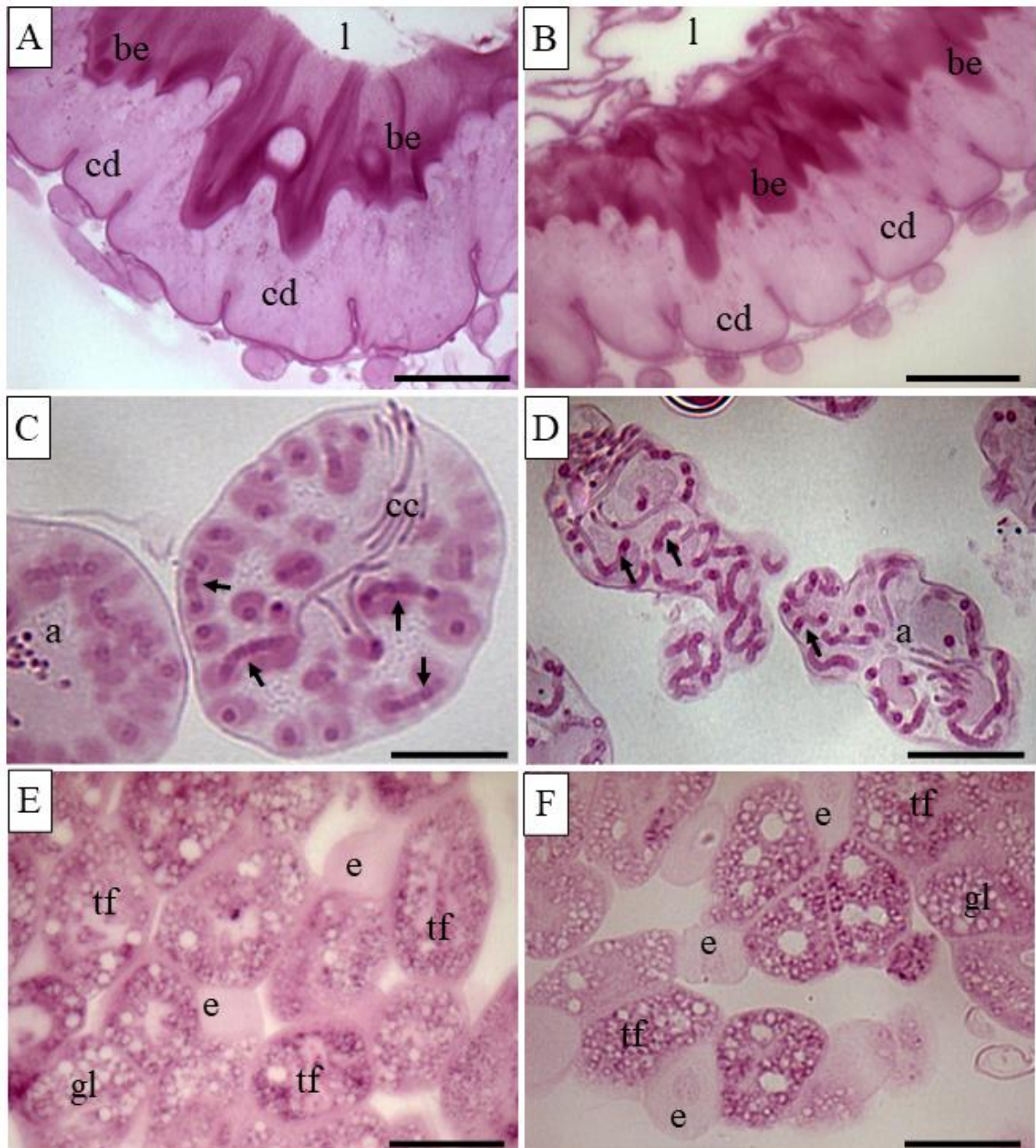


Figura 10. Micrografias de luz do intestino médio (A, B), glândula hipofaríngea (C, D) e corpo gorduroso (E, F) de *Apis mellifera* submetidas ao teste periódico de ácido-Schiff (PAS). (A, C, E) = Controle. (B, D, F) = tratamento 72h com ciflumetofem. A-B) Intestino médio completamente corado (cor fúcsia) por PAS indicando reação positiva. Observe a borda estriada (be) intensamente corada. C-D) Cortes transversais e longitudinais, respectivamente, dos ácinos (a) que formam a glândula hipofaríngea mostrando o túbulo membranoso (indicados por setas pretas) intensamente corado do aparato terminal (at) de cada célula secretora e os ductos coletores (cc) onde as secreções são liberadas. EF) Trofócitos (tf) preenchidos por gotículas lipídicas (gl) e enócitos (e) do corpo gorduroso. Barra de escala: 10 µm.

A intensidade da reação PAS no intestino médio de *A. mellifera* foi similar entre controle e exposição ao ciflumetofem em 24h ($t_{1,4} = 0,82$; $p = 0,45$), 48h ($t_{1,4} = 0,92$; $p = 0,40$) e 72h ($t_{1,4} = 0,96$; $p = 0,39$) (Fig. 11A), nas glândulas hipofaríngeas, em 24h ($t_{1,4} = 0,68$; $p = 0,53$), 48h ($t_{1,4} = 1,94$; $p = 0,12$) e 72h ($t_{1,4} = 1,97$; $p = 0,11$) (Fig. 11B) e no corpo gorduroso, em 24h ($t_{1,4} = 0,15$; $p = 0,88$), 48h ($t_{1,4} = 1,49$; $p = 0,20$) e 72h ($t_{1,4} = 0,67$; $p = 0,53$) (Fig. 11C).

Nos trofócitos de operárias de *A. mellifera*, a quantidade de lipídeos foi similar entre as abelhas controle e as tratadas com CL₅₀ de ciflumetofem por 24h ($t_{1,4} = 2,51$; $p = 0,0658$), 48h ($t_{1,4} = 0,96$; $p = 0,3889$) e 72h ($t_{1,4} = 0,66$; $p = 0,5417$) (Fig. 11D).

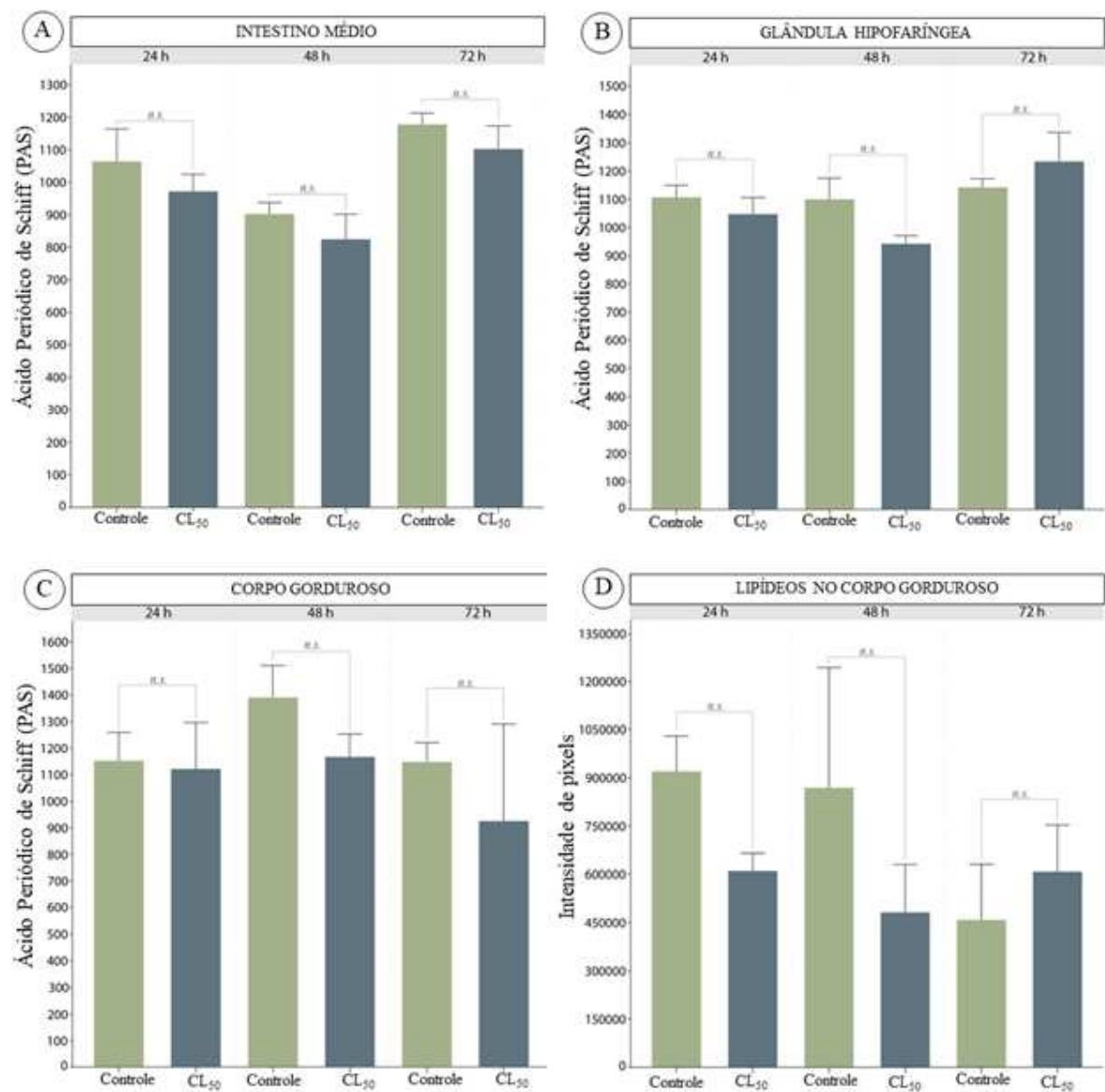


Figura 11. Intensidade da marcação positiva da técnica histoquímica do ácido periódico-Schiff (PAS) no intestino médio (A), glândula hipofaríngea (B) e corpo gorduroso (C) de *Apis mellifera* em 24h, 48h e 72h de exposição ao ciflumetofem e respectivos controles. D) Quantificação de lipídeos nos trofócitos do corpo gorduroso de *A. mellifera*. n.s. indica ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

3.4. Citotoxicidade

3.4.1. Intestino médio

As células digestivas do intestino médio das abelhas do grupo controle, apresentaram lâmina basal espessa e muitas invaginações da membrana plasmática formando um labirinto

basal bem desenvolvido (Fig. 12A), citoplasma rico em mitocôndrias e vacúolos e microvilosidades bem desenvolvidas na superfície apical (Figs. 12B, 12C).

Nas abelhas tratadas com CL₅₀ de ciflumetofem, por 24h exposição, ocorreu a presença de vários vacúolos no citoplasma das células digestivas, alguns com conteúdo em seu interior e outros aparentemente vazios (Fig. 12D). Em 48h de exposição ao ciflumetofem, o labirinto basal apresentou os espaços extracelulares dilatados (Fig. 12E) e após 72h de exposição o citoplasma estava rico em esferocristais (Fig. 12F).

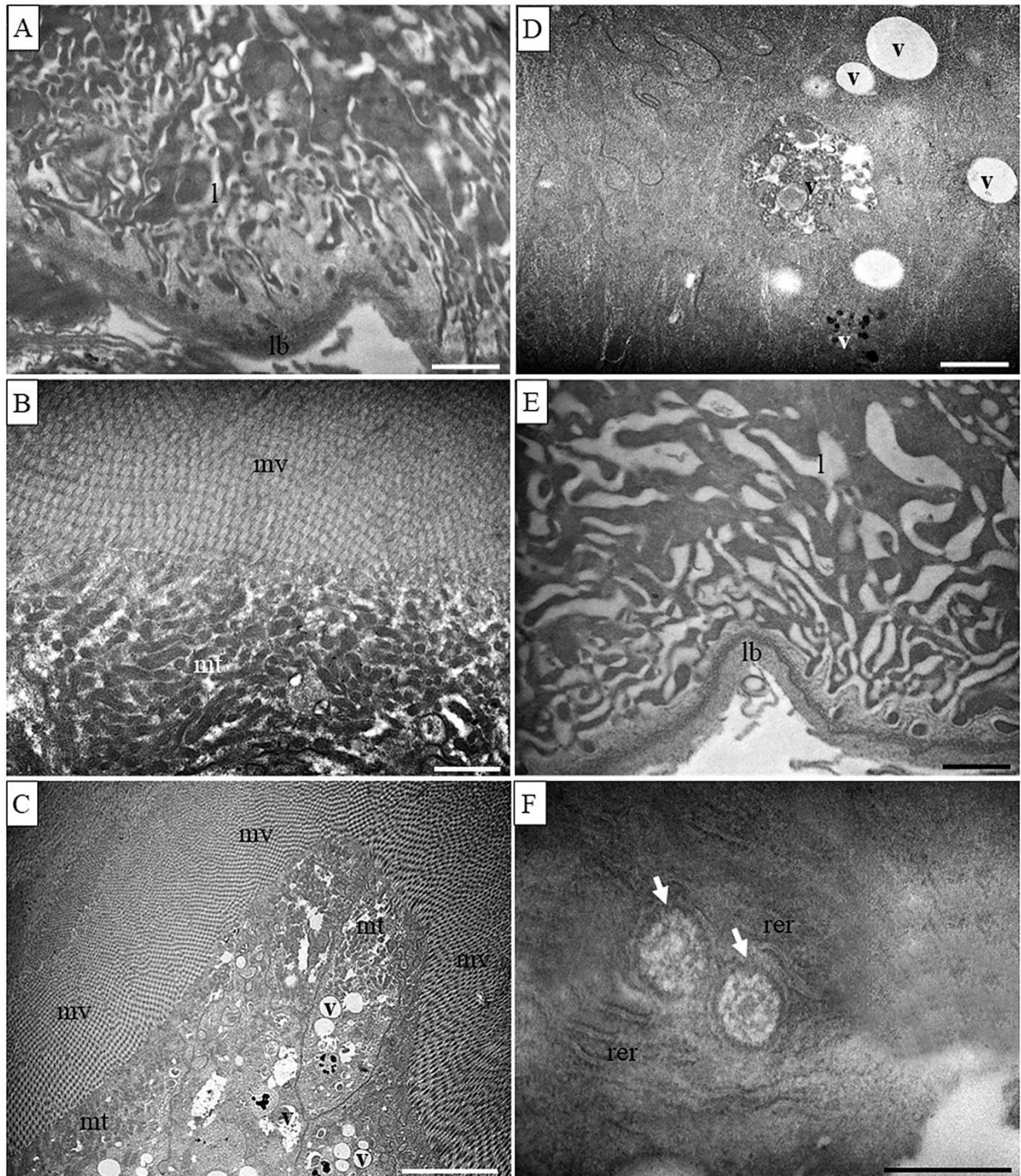


Figura 12. Micrografias eletrônicas de transmissão do intestino médio de *Apis mellifera*. A, B, C) Controle. D) 24h, E) 48h e F) 72h de exposição ao ciflumetofem. A) Região basal do intestino médio mostrando a lâmina basal (lb) e labirinto basal (l) bem desenvolvido. B) Região apical do intestino médio mostrando citoplasma com muitas mitocôndrias (mt) e abundância de microvilosidades (mv). C) Região apical do intestino médio apresentando microvilosidades e citoplasma com mitocôndrias e vacúolos (v). D) Citoplasma de célula digestiva com presença de vários vacúolos. E) Região basal do intestino médio mostrando labirinto basal com espaços dilatados e lâmina basal. F) Citoplasma de célula digestiva mostrando presença de retículo endoplasmático rugoso (rer) e esferocristais (indicados pelas setas brancas). Barra de escala: A, B, D, E) = 1 μ m, C) = 5 μ m, F) = 500 nm.

3.4.2. Glândula hipofaríngea

As células secretoras das glândulas hipofaríngeas das abelhas do grupo controle apresentaram aparato terminal com secreção elétron lúcida em seu lúmen (Fig. 13A). Nas glândulas hipofaríngeas das abelhas alimentadas com ciflumetofem por 24h ocorreram algumas vesículas de secreção no citoplasma das células secretoras, presença de retículo endoplasmático rugoso, aparato terminal dilatado formando sáculos preenchidos com secreção (Fig. 13B). Em 48h de exposição ao ciflumetofem, ocorreu abundância de vesículas de secreção, algumas elétron-lúcidas bem desenvolvidas e outras menores elétron-densas, aparato terminal com sáculos pouco dilatados e secreção no lúmen (Fig. 13C). Em 72h de exposição, o aparato terminal apresentou sáculos bem dilatados contendo secreção e o citoplasma com muito retículo endoplasmático rugoso (Fig. 13D).

4.4.3. Corpo gorduroso

Nos trofócitos do corpo gorduroso não foram observadas diferenças ultraestruturais entre tratamento e controle. Essas células apresentaram a membrana plasmática com invaginações formando um labirinto periférico curto e citoplasma rico em gotículas lipídicas com algumas inclusões elétron densas em seu interior (Fig. 14A-B).

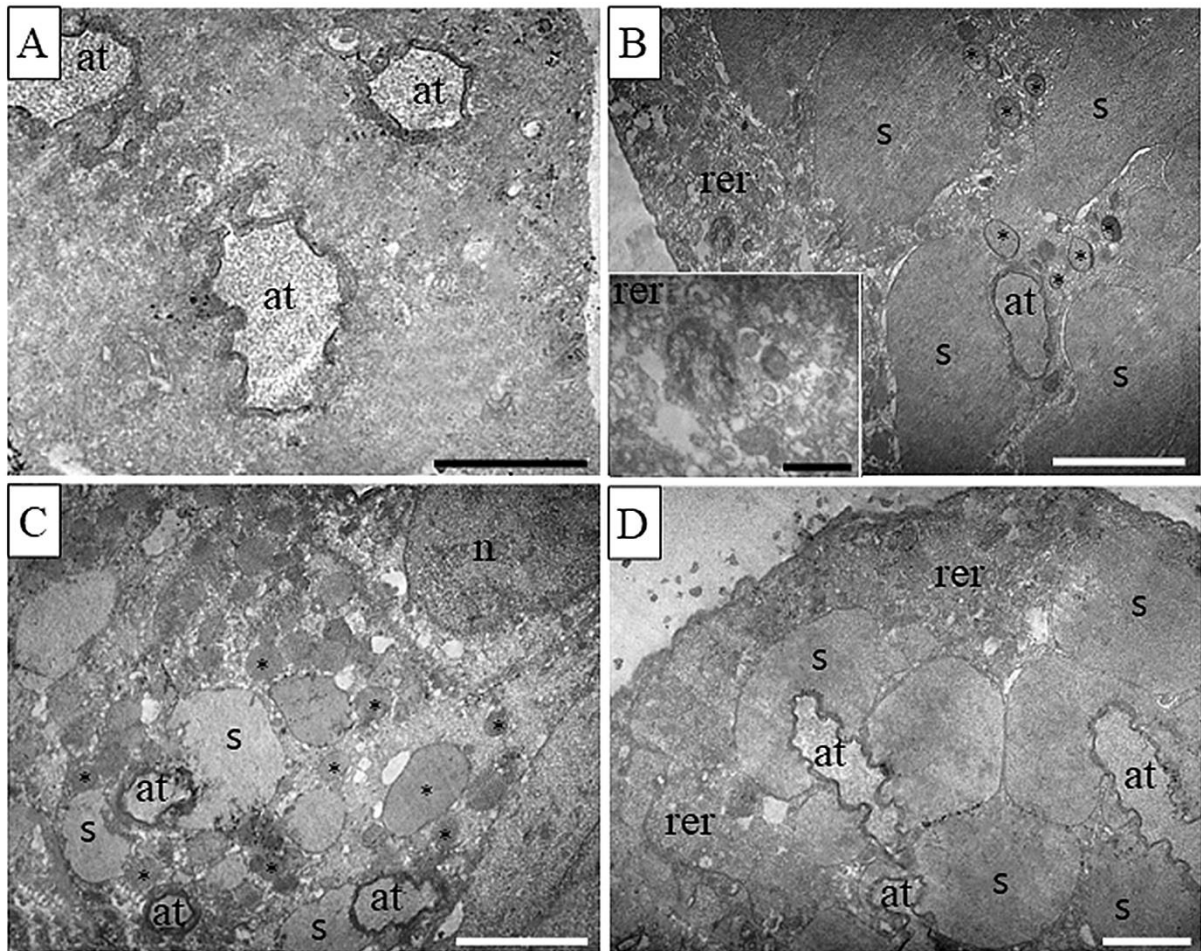


Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão de glândula hipofaríngea de *Apis mellifera*. A) Controle. B) 24h, C) 48h e D) 72h de exposição ao ciflumetofem. A) Citoplasma de célula secretora mostrando aparato terminal (at) com secreção eletrón lúcida em seu lúmen. B) Vesículas de secreção (*) no citoplasma das células secretoras, retículo endoplasmático rugoso (rer) (em detalhe), aparato terminal e dilatação de parte do aparato terminal formando sáculos dilatados preenchidos com secreção (s). C) Abundância de vesículas de secreção no citoplasma das células secretoras, aparato terminal com secreção no lúmen, sáculos do aparato terminal pouco dilatados, indicando pouca secreção e núcleo da célula. D) Aparato terminal com secreção no lúmen, sáculos bem dilatados contendo secreção e retículo endoplasmático rugoso (rer). Barra de escala: A, D) = 2 μ m, B, C) = 5 μ m.

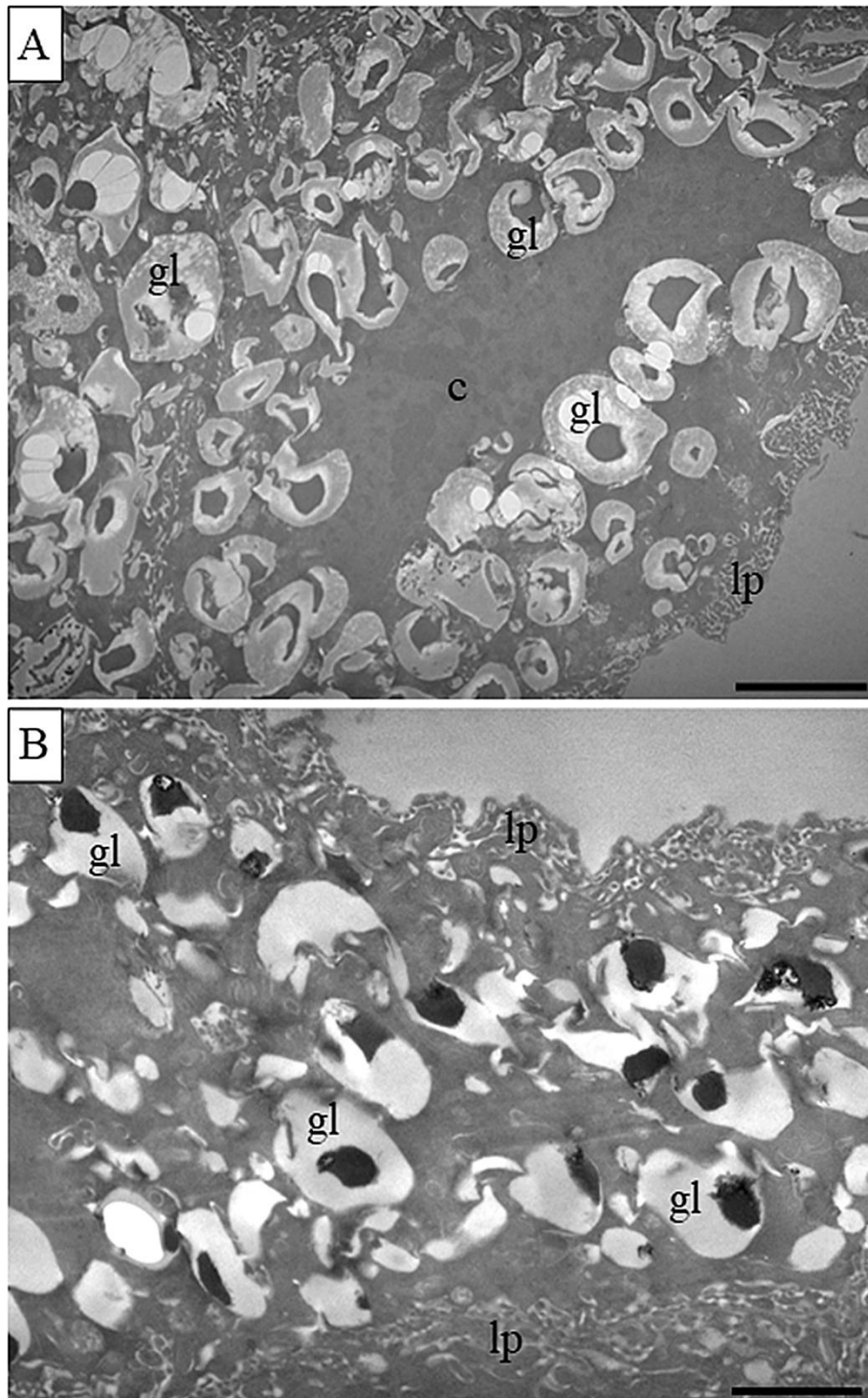


Figura 14. Micrografias eletrônicas de transmissão de trofócitos de *Apis mellifera*. A) Controle. B) 72h de exposição ao ciflumetofem. A, B) Trofócito formado por labirinto periférico (lp) e citoplasma (c) preenchido por gotículas lipídicas (gl) com inclusões eletrodensas em seu interior. Barra de escala: A) 5 μ m, B) 2 μ m.

4. DISCUSSÃO

O teste de concentração mortalidade revela que o ciflumetofem é tóxico para operárias de *A. mellifera* com a CL_{50} de 2,54 g/L. Esse valor é 30 vezes superior àquele obtido para a abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) que foi 0,08 g/L de ciflumetofem, com mortalidade de 4% a 12% das abelhas até 96 horas com diferentes modos de exposição (Leite et al., 2021). Isso nos mostra que o ciflumetofem é menos tóxico para *A. mellifera* do que para *T. angustula*. Assim, diferentes espécies de abelhas apresentam diferentes respostas toxicológicas ao ciflumetofem.

Além da mortalidade, o ciflumetofem causa danos ao intestino médio de operárias de *A. mellifera*. A maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos nos intestinos médios das abelhas tratadas com a CL_{50} de ciflumetofem após 24h, 48h e 72h de exposição, em relação ao controle, tanto na microscopia de luz, como na microscopia eletrônica de transmissão, pode ser devido a ocorrência de autofagia, similar ao observado para os pesticidas fipronil e ácido bórico (Cruz et al., 2010), lambda-cihalotrina (Arthidoro de Castro et al., 2020), iprodiona (Carneiro et al., 2020), espiromesifeno (Serra et al., 2021) e imidaclopride (Carneiro et al., 2022). Embora seja comum a presença de vacúolos nas células digestivas, a ocorrência destes em grande quantidade é característico de células em processo de autofagia durante a renovação de organelas e reorganização do citoplasma (Madeo et al., 2015). A autofagia é importante para a homeostase celular (Wirawan et al., 2012) e pode ser ativada em resposta a privação de nutrientes e estresse celular (Zhang et al., 2017; Mercer et al., 2018), podendo ser um mecanismo de sobrevivência por melhorar as condições celulares (Wirawan et al., 2012; Rai et al., 2018). Entretanto, a autofagia também pode contribuir para a morte celular por apoptose em caso de esgotamento dos principais reguladores que incluem várias proteínas apoptóticas (Wirawan et al., 2012). Sendo assim, pode ser sugerido que o ciflumetofem gera estresse celular ativando processos

autofágicos nas células do intestino médio e podendo levar a apoptose, causando danos nesse órgão em *A. mellifera*.

O intestino médio das abelhas tratadas com ciflumetofem por 24h, 48h e 72h, apresentam liberação de vesículas. Liberação de vesículas pelas células é caracterizada pela presença de protrusões na superfície apical do epitélio intestinal (Cruz-Landim et al., 1996). O aumento na liberação de vesículas é uma resposta das células digestivas à exposição ao ciflumetofem, pois está ligada ao processo de detoxificação para reduzir os efeitos dos pesticidas (Martínez et al., 2018; dos Santos-Junior et al., 2019). Esse mecanismo de detoxificação no intestino médio, ocorre pela ação de enzimas (glicosiltransferases, citocromos P450, carboxilases, esterases, glutathione-S-transferases) que protegem as células de produtos químicos e efeitos físicos (Rand et al., 2015). Essas enzimas são armazenadas em vesículas presentes no citoplasma das células digestivas e são liberadas via secreção apócrina (Aumüller et al., 1999), que resulta em perda de 10% do material citoplasmático apical (Terra e Ferreira, 2012). A liberação dessas vesículas contendo enzimas é intensificada quando o intestino médio é exposto a agentes xenobióticos (Ferreira et al., 1990; Cristofolletti et al., 2001).

As células do epitélio intestinal com fragmentos sendo eliminados no lúmen como observado nas abelhas tratadas com ciflumetofem, têm sido associadas com a incapacidade de as células realizarem suas funções adequadamente (Grella et al., 2019). Esse dano histopatológico foi reportado no intestino médio de abelhas expostas ao fipronil e ácido bórico (Cruz et al., 2010; Farder-Gomes et al., 2021), picoxistrobina (Batista et al., 2020), iprodiona (Carneiro et al., 2020), espiromesifeno (Serra et al., 2021), imidaclopride (Carneiro et al., 2022) e azoxystrobina (Serra et al., 2023). Essas células são substituídas por novas células digestivas resultantes da diferenciação de células regenerativas (Batista et al., 2020) presentes na porção basal do epitélio (Cruz-Landim e Cavalcante, 2003), para que as funções do intestino não sejam prejudicadas (Kakamand et al., 2008). Esse processo de renovação celular também ocorre em

abelhas saudáveis para a manutenção do epitélio, de maneira semelhante ao que ocorre devido a exposição ao pesticida. Contudo, esse processo ocorre de forma mais acentuada quando o intestino médio é exposto a estressores como o ciflumetofem.

As alterações histopatológicas observadas no intestino médio das abelhas tratadas com ciflumetofem também indicam efeitos subletais. Esses efeitos ocorrem quando um composto químico não causa a morte imediata do organismo, mas gera alterações comportamentais, no desenvolvimento, reprodução, imunidade e aprendizagem das abelhas (Chmiel et al., 2020; Souza et al., 2023). Essas mudanças comprometem, a longo prazo, a sobrevivência dos insetos (Chaves et al., 2023), levando a uma redução populacional (Zaluski et al., 2015). Ainda, é importante ressaltar que, alguns pesticidas quando em combinação, têm potencial para aumentar a toxicidade devido a efeitos interativos (Johnson et al., 2013). Nesse sentido, as abelhas podem ser contaminadas por diferentes produtos químicos durante o forrageio e, portanto, esse efeito interativo deve ser avaliado.

As análises do índice de lesão no intestino médio de *A. mellifera* mostram diferenças significativas em 48h de exposição ao ciflumetofem em relação ao controle, principalmente nos danos reversíveis, o que pode explicar o fato de que em 72h de exposição ao ciflumetofem, não há diferença em relação ao controle, provavelmente devido ao fato do intestino médio produzir enzimas detoxificantes que reverterem ou mitigam os danos observados em 48h de exposição. Assim, é plausível sugerir que o ciflumetofem causa efeitos negativos ao intestino médio de *A. mellifera* podendo afetar as funções desse órgão no curto prazo, mas após 72h o órgão pode recuperar em parte suas funções, sendo necessários estudos para avaliar o efeito da exposição crônica.

Em relação a citotoxicidade do intestino médio, após 48h de exposição ao ciflumetofem, há aumento na dilatação do labirinto basal das células digestivas formados pelas invaginações da membrana plasmática, assim como relatado em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Fiaz et

al., 2018), larvas de *Aedes aegypti* (Fiaz et al., 2019) e adultos de *Podisus nigrispinus* (dos Santos-Junior et al., 2020) expostos a diferentes inseticidas. Essa dilatação no labirinto basal indica maior transporte de substâncias entre a hemolinfa e o citosol das células (Cruz-Landim, 2009), o que pode ser devido aos processos de detoxificação no intestino médio. Nessas células digestivas, também ocorre a presença de esferocristais no citoplasma, estruturas com conteúdo mineral organizado em camadas concêntricas (Pinheiro et al., 2008) com funções de armazenamento e excreção (Turbeck 1974; Waku e Sumimoto, 1974; Cruz-Landim e Serrão, 1997; Ballan-Dufrançais, 2002; Pinheiro et al., 2008; Lipovšek et al., 2012; Mutlu e Suludere, 2020). Esferocristais contribuem para o endurecimento do exoesqueleto e participam dos processos de detoxificação nos insetos (Lipovšek et al., 2002), sendo o local de armazenamento de excreção de substâncias tóxicas e de materiais residuais não tóxicos (Cruz-Landim e Serrão, 1997), o que é suportado pela presença de esferocristais apenas nas células digestivas de abelhas expostas ao ciflumetofem.

As glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* tratadas com ciflumetofem (CL₅₀) em 24h, 48h e 72h não apresentam danos histopatológicos, como observado para esta glândula em abelhas expostas ao inseticida lambda-cialotrina (Arthidoro de Castro et al., 2020). Mas na análise da ultraestrutura foi possível observar que nas abelhas tratadas com ciflumetofem, as glândulas hipofaríngeas estão mais desenvolvidas, com maiores quantidades de secreção no citoplasma e no interior do aparato terminal, formando sáculos dilatados. Em *A. mellifera* as glândulas hipofaríngeas estão ativas a partir do sétimo dia após a emergência, com o pico de desenvolvimento entre o 6° e o 12° dia (Qin et al., 2022). Além disso, a glândula hipofaríngea tem sua atividade regulada por feromônios das larvas e da glândula mandibular da rainha (Peters et al., 2010), os quais estavam ausentes nas condições do experimento. Sendo assim, de alguma forma o ciflumetofem altera o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas antecipando a atividade secretora, o que pode afetar a colônia como um todo, pois a secreção dessas glândulas

é a geleia real, principal fonte de alimento para as larvas até o segundo dia de vida (Hrassnigg e Crailsheim, 1998) com papel essencial na dieta e diferenciação de castas (Kamakura, 2011). Uma possível explicação é que o ciflumetofem interfere na regulação da síntese do hormônio juvenil que participa da regulação secretora da glândula hipofaríngea (Gracioli e Silva de Moraes, 2002; Corby-Harris et al., 2016). Abelhas operárias nutridoras tem baixos títulos circulantes de hormônio juvenil e glândulas hipofaríngeas bem desenvolvidas (Elekonich et al., 2001), enquanto que nas abelhas forrageiras, as glândulas hipofaríngeas regridem e ocorre aumento nos títulos do hormônio juvenil (Huang et al., 1994). Portanto, o desenvolvimento antecipado da glândula hipofaríngea nas abelhas expostas ao ciflumetofem, indica alterações no ciclo de desenvolvimento dessa glândula, o que pode afetar a homeostase da colônia, pois operárias nutridoras com o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas prejudicado se tornam forrageadoras mais rapidamente (Hatjina et al., 2013), assim como as abelhas tratadas com hormônio juvenil ou seus análogos (Jaycox et al., 1974; 1976; Robinson 1985; 1987). Contudo, a regulação hormonal em um organismo é complexa e envolve um grande número de fatores (Li et al., 2021), portanto são necessários mais estudos para a compreensão dos eventos associadas com as alterações nas glândulas hipofaríngeas causados pelo ciflumetofem.

Os resultados aqui apresentados em relação ao corpo gorduroso, onde não foi possível encontrar diferenças na morfologia dos trofócitos e enócitos entre as abelhas alimentadas com solução de ciflumetofem (CL₅₀) e as controle, são semelhantes àqueles relatados para o fungicida picoxistrobina para esta espécie de abelha (Domingues et al., 2017). Entretanto, danos ao corpo gorduroso tais como vacuolização, células atípicas, núcleo picnótico, diminuição nas áreas das células e alterações nucleares tem sido reportadas para abelha solitária *Tetrapedia diversipes* com o inseticida imidaclopride (de Assis et al., 2022) e em *A. mellifera* com o fungicida piraclostrobina (Inoue et al., 2022). Isso indica que cada pesticida tem diferentes efeitos no corpo gorduroso de diferentes abelhas.

Operárias de *A. mellifera* após exposição oral ao ciflumetofem apresentam diminuição das proteínas no corpo gorduroso após 24h e no epitélio do intestino médio após 48h de exposição ao ciflumetofem como detectado pela histoquímica, provavelmente devido à mobilização das proteínas envolvidas no processo de detoxificação. Algumas enzimas envolvidas no processo de detoxificação em insetos são glicosiltransferases, citocromos P450, carboxilases, esterases e glutathione-S-transferases (Li et al., 2007; Meech et al., 2012) que podem estar sendo mobilizadas no corpo gorduroso durante o processo de detoxificação. Ainda, é importante ressaltar que, o corpo gorduroso produz outras proteínas, tais como aquelas de armazenamento usadas como reservatório de aminoácidos para a morfogênese, lipoforinas responsáveis pelo transporte de lipídeos na circulação e vitelogeninas para a maturação dos ovos (Keeley, 1985). Dessa forma, essa variação na quantidade de proteínas presentes no intestino médio e no corpo gorduroso de *A. mellifera* em resposta ao ciflumetofem, afetam o metabolismo da abelha em resposta às demandas fisiológicas desse inseto.

Um resultado intrigante foi a ausência de diferença nas quantidades de glicogênio e lipídeos nas células do corpo gorduroso, moléculas importantes como fontes imediatas de energia para o metabolismo celular. Em *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), os insetos resistentes aos inseticidas utilizados para o controle em grãos armazenados, apresentam maiores reservas dessas moléculas energéticas nos trofócitos que os susceptíveis (Guedes et al., 2006). A ausência de diferenças entre o corpo gorduroso das abelhas tratadas com ciflumetofem e controle, pode ser devido ao intestino médio ter sido uma barreira eficaz, impedindo a ação do ciflumetofem no corpo gorduroso.

5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui observados no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *A. mellifera* após exposição aguda a ciflumetofem, mostram que esse pesticida apresenta toxicidade com a concentração de 2,54 g/L, gera danos no intestino médio e alterações

na glândula hipofaríngea das abelhas, o que pode afetar os processos digestivos e toda a população da colônia. Portanto, a classificação desse composto como sem efeitos ou com impacto limitado em artrópodes benéficos e inimigos naturais e com recomendação para uso no manejo integrado de pragas necessita ser reavaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizen, M. A., Aguiar, S., Biesmeijer, J. C., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W., Jung, C., Martins, D.J., Medel, R., Morales, C.L., Ngo, H., Pauw, A., Paxton, R.J., Saéz, A., Seymour, C. L. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* 25, 3516-3527.
- Alonso-Prados, E., Muñoz, I., De la Rúa, P., Serrano, J., Fernández-Alba, A. R., García-Valcárcel, A. I., Hernando, M.D., Alonso, A., Alonso-Prados, J.L., Bartolomé, C., Maside, X., Barrios, L., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2020). The toxic unit approach as a risk indicator in honey bee surveillance programmes: A case of study in *Apis mellifera iberiensis*. *Science of The Total Environment* 698, 134208.
- Arthidoro de 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.
- Aumüller, G., Wilhelm, B., Seitz, J. (1999). Apocrine secretion—fact or artifact? *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 181, 437-446.
- Ballan-Dufrançais, C. (2002). Localization of metals in cells of pterygote insects. *Microscopy Research and Technique* 56, 403-420.
- 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, 834-843.

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25–34.
- Borges, R. C., Brito, R. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Giannini, T. C. (2020). The value of crop production and pollination services in the Eastern Amazon. *Neotropical Entomology* 49, 545-556.
- 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., Medeiros-Santana, L., 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.
- 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.
- Corby-Harris, V., Meador, C. A., Snyder, L. A., Schwan, M. R., Maes, P., Jones, B. M., Alexander, W., Anderson, K. E. (2016). Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. *Journal of Insect Physiology* 85:65-75.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology* 8, 1e20.
- Chaves, A., Faita, M. R., Nodari, R. O. (2023). Effects of fungicides on the ultrastructure of the hypopharyngeal glands and the strength of the hives of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Toxicology and Applied Pharmacology* 459, 116340.

- Chen, X., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, J., Li, Y., Li, M., Wang, Y., Zheng, Y. (2013). Chiral determination of a novel acaricide cyflumetofen enantiomers in cucumber, tomato, and apple by HPLC. *Journal of Separation Science* 36, 225-231.
- Cheon, H. M., Shin, S. W., Bian, G., Park, J. H., Raikhel, A. S. (2006). Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biology Chemistry* 281, 8426–35.
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., Reid, G. (2020). Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: a role for probiotics as mediators of environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8, 22.
- Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F., Terra, W. R. (2001). Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* 47, 143-155.
- Cruz, A. D. S., Elaine, C., Da Silva-Zacarin, M., Bueno, O. C., Malaspina, O. (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biology and Toxicology* 26, 165–176.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J. E., Silva-de-Moraes, R. L. M. (1996). Cytoplasmic protrusion from digestive cells of bees. *Cytobios* 88, 95–194.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J. E. (1997). Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology* 21-29.
- Cruz-Landim, C., Cavalcante, V. M. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Science* 20, 1099-1107.
- Cruz-Landim C. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. SciELO-Ed, São Paulo.

- 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.
- Delaplane, K. S., Mayer, D. F. (2000). *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing, New York.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C., Wiesner, A. (2001). Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell and Tissue Research* 306, 449–58.
- 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.
- dos Santos-Junior, V. C., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Bozdoğan, H., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2019). Exposure to spinosad induces histopathological and cytotoxic effects on the salivary complex of the non-target predator *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 225, 688-695.
- dos Santos-Junior, V. C., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F. L., de Souza Tavares, W., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2020). Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 238, 124585.
- Elekovich, M. M., Schulz, D. J., Bloch, G., Robinson, G. E. (2001). Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation. *Journal of Insect Physiology* 47: 1119-1125.

- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., Serrão, J. E. (2021). 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.
- Ferreira, C., Bellinello, G. L., Ribeiro, A. F., Terra, W. R. (1990). Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry* 20, 839-847.
- Fiaz, M., Martínez, L. C., da Silva Costa, M., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Sant'Ana, A. E. G., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156, 1-8.
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., de Souza, D. L. L., Cossolin, J. F. S., Carvalho, P. E. G. R., Martins, G. F., Serrão, J. E. (2019). Pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, damages midgut cells and interferes with behaviors of *Aedes aegypti* larvae. *PeerJ* 7, e7489.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 810-821.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957.
- Grab, H., Branstetter, M. G., Amon, N., Urban-Mead, K. R., Park, M. G., Gibbs, J., Blitzer, E. J., Poveda, K., Loeb, G., Danforth, B. N. (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363, 282–284.

- Gracioli, L.F., Silva de Moraes, R. L. M. (2002). Juvenile hormone promotes changes in the expression of hypopharyngeal gland proteins of worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 40: 443–448.
- Gradish, A. E., Van Der Steen, J., Scott-Dupree, C. D., Cabrera, A. R., Cutler, G. C., Goulson, D., Klein, O., Lehmann, D. M., Lückmann, J., O’Neill, B., Raine, N. E., Sharma, B., Thompson, H. (2019). Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology* 48, 12-21.
- Grant, K. J., DeVetter, L., Melathopoulos, A. (2021). Honey bee (*Apis mellifera*) colony strength and its effects on pollination and yield in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*). *PeerJ* 9, e11634.
- Gregorc, A. (2020). Monitoring of honey bee colony losses: A special issue. *Diversity* 12, 403.
- Grella, T. C., Soares-Lima, H. M., Malaspina, O., Nocelli, R. C. F. (2019). Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere* 236, 124255.
- 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, 30-38.
- Guimarães-Cestaro, L., Martins, M.F., Martínez, L.C., Alves, M. L. T. M. F., Guidugli-Lazzarini, K. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Serrão, J. E., Teixeira, É. W. (2020). Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *The Science of Nature* 107, 1-14.
- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44: 467-480.

- Heylen, K., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R., Billen, J. (2011). The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 42, 103-116.
- Hipólito, J., Sousa, B. D. S. B., Borges, R. C., de Brito, R. M., Jaffé, R., Dias, S., Fonseca, V. L. I., Giannini, T. C. (2019). Valuing nature's contribution to people: The pollination services provided by two protected areas in Brazil. *Global Ecology and Conservation* 20, e00782.
- Hrassnigg, N., Crailsheim, K. (1998). Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology* 44, 929-939.
- Huang, Z. Y., Robinson¹, G. E., Borst, D. W. (1994). Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *Journal of Comparative Physiology A* 174: 731-739.
- Inoue, L. V., Domingues, C. E., Gregorc, A., Silva-Zacarin, E. C., Malaspina, O. (2022). Harmful effects of pyraclostrobin on the fat body and pericardial cells of foragers of Africanized honey bee. *Toxics* 10, 530.
- Jaycox, E. R., Skowronek, W., Gwynn, G. (1974). Behavioral changes in a worker honey bee (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. *Annals of the Entomological Society of America* 67: 529–534.
- Jaycox, E. R. (1976). Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49: 165–170.
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., Ellis, M. D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS One* 8, e54092.

- Kakamand, F. A. K., Mahmoud, T. T., Amin, A. B. M. (2008). The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Dohuk University* 11, 144-151.
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473, 478–483.
- Keeley, L. L. (1985). Physiology and biochemistry of the fat body. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 211e248, v. 3.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Posyniak, A. (2016). Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science* 60, 5.
- Leite, D. T., Sampaio, R. B., Chambó, E. D., Aguiar, C. M. L., de Godoy, M. S., de Carvalho, C. A. L. (2021). Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science* 42, 435-443.
- Li, X., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231-253.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Qin, D., Zheng, Y. (2012). Determination of cyflumetofen residue in water, soil, and fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35, 2743–2749.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Li, Y., Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and

- ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1300, 95-103.
- Li, H., Liu, S., Chen, L., Luo, J., Zeng, D., Li, X. (2021). Juvenile hormone and transcriptional changes in honey bee worker larvae when exposed to sublethal concentrations of thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225, 112744.
- Li, Z., Yang, H., Yu, L., Liu, C., Wu, X. (2022). The negative effect of flumethrin stress on honey bee (*Apis mellifera*) worker from larvae to adults. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 188, 105289.
- Lillie, R. D. (1965). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*; 3rd Ed. McGrawHill Book Co., New York.
- Lipovšek, S., Letofsky-Papst, I., Hofer, F., Pabst, M. A. (2002). Seasonal-and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyias annulatus* (Opiliones). *Micron* 33, 647-654.
- Lipovšek, S., Letofsky-Papst, I., Hofer, F., Pabst, M. A., Devetak, D. (2012). Application of analytical electron microscopic methods to investigate the function of spherites in the midgut of the larval antlion *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Microscopy Research and Technique* 75, 397-407.
- Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M. C., Kroemer, G. (2015). Essential role for autophagy in life span extension. *The Journal of Clinical Investigation* 125, 85-93.
- 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.
- McGregor, S. E. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. US Department of Agriculture, Washington, DC.

- Meech, R., Miners, J. O., Lewis, B. C., Mackenzie, P. I. (2012). The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & therapeutics* 134, 200-218.
- Mercer, T. J., Gubas, A., Tooze, S. A. (2018). A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 293, 5386-5395.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press.
- Mirth, C.K., Riddiford, L.M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays* 29, 344–55.
- Mutlu, D. A., Suludere, Z. (2020). The spherocrystals in the tubule epithelial cells and ultrastructure of the Malpighian tubules of adult *Isophya nervosa* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Gazi University Journal of Science* 33, 630-644.
- Nielsen, A., Reitan, T., Rinvoll, A. W., Brysting, A. K. (2017). Effects of competition and climate on a crop pollinator community. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 246, 253-260.
- OCDE- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 1998. *Teste nº 213, Seção 2*.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biology* 5, e168.
- Peters, L., Zhu-Salzman, K., Pankiw, T. (2010). Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 56, 132-137.
- Pinheiro, D. O., Conte, H., Gregório, E. A. (2008). Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *Biocell* 32, 61-67.

- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 345-353.
- Powney, G. D., Carvell, C., Edwards, M., Morris, R. K., Roy, H. E., Woodcock, B. A., Isaac, N. J. (2019). Widespread losses of pollinating insects in Britain. *Nature Communications* 10, 1018.
- Rai, A., Singh, P. K., Singh, V., Kumar, V., Mishra, R., Thakur, A. K., Mahadevan, A., Shankar, S.K., Jana, N.R., Ganesh, S. (2018). Glycogen synthase protects neurons from cytotoxicity of mutant huntingtin by enhancing the autophagy flux. *Cell Death & Disease* 9, 1-15.
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W., Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports* 5, 1-11.
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Version 4.0.2), Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>.
- Robinson, G. E. (1985). Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology* 31: 277-282.
- Robinson, G. E. (1987). Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 329-338.
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron* 41, 395-401.
- 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.

- 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.
- Sgolastra, F., Hinarejos, S., Pitts-Singer, T. L., Boyle, N. K., Joseph, T., Lückmann, J., Raine, N.E., Singh, R., Williams, N.M., Bosch, J. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environmental Entomology* 48, 22-35.
- Sierotzki, H., Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103, 880-887.
- Škerl, M. I. S., Gregorc, A. (2010). Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* 41, 73-86.
- Solomon, R. W. (2009). Free and open-source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology*, 192, 330-334.
- Souza, C. O., Wanderley Teixeira, V., Cruz, G. D. S., Guedes, C. A., Nascimento, J. C. D. S., Cavalcanti Lapa Neto, C. J., Teixeira, Á. A. C. (2023). Toxicology, histophysiological and nutritional changes in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submitted to limonene and natural pesticides in comparison to synthetic pesticides. *Journal of Apicultural Research* 1-12.
- Stefanini, M., De Martino, Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174.
- Sun, D., Pang, J., Zhou, Z., Jiao, B. (2016). Enantioselective environmental behavior and cytotoxicity of chiral acaricide cyflumetofen. *Chemosphere* 161, 167-173.

- Takahashi, N., Nakagawa, H., Sasama, Y., Ikemi, N. (2012). Development of a new acaricide, cyflumetofen. *Journal of Pesticide Science* J12-03.
- Terra, W. R., Ferreira, C. (2012). *Biochemistry and molecular biology of digestion. Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, pp. 365e418.
- Toth, A. L., Robinson, G. E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour* 69, 427-435.
- Turbeck, B. (1974). A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue & Cell* 6: 627-640.
- Urstadt, K. R. (2022). Staining intensity quantification protocol. https://docs.google.com/document/d/1BagSem-WTosS1PKZo17T40u7fZFIPdIIr1Yuwg4EF_A/edit#heading=h.bxx1hlqvtvka.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R., Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One* 4, e6481.
- vanEngelsdorp, D., Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S80-S95.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. A., (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* 73, R117-R124.
- Waku, Y., Sumimoto, K.I. (1974). Metamorphosis of the midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. II. Electron microscopy. *Tissue & Cell* 6, 127–136.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.

- Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J. J. M., Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* 52, 52104.
- Winfree, R., Gross, B. J., Kremen, C. (2011). Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics* 71, 80-88.
- Wirawan, E., Berghe, T. V., Lippens, S., Agostinis, P., Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Research*, 22, 43-61.
- Zaluski, R., Kadri, S. M., Alonso, D. P., Martins Ribolla, P. E., de Oliveira Orsi, R. (2015). Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1062-1069.
- Zattara, E. E., Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114-123.
- Zhang, W., Wan, X., Liu, Z., Xiao, L., Huang, H., Liu, X. (2017). The emerging role of oxidative stress in regulating autophagy: applications of cancer therapy. *Cellular and Molecular Biology* 63, 67-76.

CAPÍTULO 2

**EFEITO SUBLETAL DO PESTICIDA CIFLUMETOFEM
NO INTESTINO MÉDIO, GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS E CORPO
GORDUROSO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA:
APIDAE)**

RESUMO

A abelha *Apis mellifera* é polinizadora de várias culturas agrícolas em todo o mundo, além de ser um importante bioindicador de poluição ambiental. Nos últimos anos, tem ocorrido declínio nas populações de espécies de abelhas com causas multifatoriais, entre elas, a intensificação no uso de pesticidas na agricultura. O ciflumetofem é utilizado para o controle de ácaros pragas em plantações de citros, café e maçã, culturas que são polinizadas por abelhas e, portanto, podem ser contaminadas durante sua atividade de forrageio. Sendo assim, esse estudo avaliou os efeitos da concentração subletal (5 ppm) de ciflumetofem no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera* com exposição oral por 72h e 10 dias. O epitélio do intestino médio das abelhas tratadas apresentou células digestivas com intensa vacuolização citoplasmática e fragmentação celular, indicativos de autofagia e morte celular. O intestino médio apresentou maior índice de lesão em 72h de exposição ao ciflumetofem que as abelhas do controle e aquelas expostas por 10 dias, indicando possível recuperação do órgão. Nas glândulas hipofaríngeas das abelhas tratadas com ciflumetofem, o aparato terminal estava cheio de secreção formando sáculos dilatados, sugerindo que o pesticida interfere na regulação secretora dessa glândula. Os testes histoquímicos revelaram diferenças entre controle e tratamento tanto em 72h, como em 10 dias de exposição ao ciflumetofem. O pesticida causou efeitos citotóxicos no intestino médio, com células digestivas apresentando protrusões apicais, ruptura da membrana plasmática, extravasamento do citoplasma e muitos vacúolos no citoplasma, características que indicam degeneração celular. Nas glândulas hipofaríngeas, as células secretoras apresentaram pequenos grânulos de secreção elétron-densos e alguns grânulos maiores de secreção elétron-lúcidos. O corpo gorduroso não apresentou alterações. Os resultados indicam que o ciflumetofem em concentração subletal causa danos no intestino médio e alterações na glândula hipofaríngea de operárias de *A. mellifera*, podendo comprometer as funções desses órgãos e afetar a manutenção da colônia.

1. INTRODUÇÃO

A polinização é fundamental para a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas, permitindo a reprodução de espécies de plantas silvestres e cultivadas, através da produção de sementes e frutos (Stančić e Fiket, 2023). Cerca de 75% de todas as plantações agrícolas são polinizadas por insetos, primariamente as abelhas (Potts et al., 2010), que representam o grupo mais importante de polinizadores (Ferenczi et al., 2023). Segundo a United Nations Food and Agriculture Organization (FAO) cerca de 90% da produção de alimentos no mundo são provenientes de culturas polinizadas principalmente por abelhas (Klein et al., 2007). Dentre as abelhas, *Apis mellifera* é o polinizador economicamente mais valioso de várias monoculturas em todo o mundo e seus produtos são utilizados como alimento, matéria-prima e na indústria farmacêutica (Papa et al., 2022). Entretanto, *A. mellifera* pode ser contaminada e acumular poluentes durante atividades de forrageio, sendo assim um importante bioindicador de poluição ambiental (Papa et al., 2022).

Estudos têm reportado um declínio nas populações de várias espécies de abelhas, devido a diversos fatores, tais como: uso de pesticidas nas plantações, infecções por patógenos e parasitas, poluição ambiental, fragmentação e perda de habitats naturais, monoculturas e mudanças climáticas (vanEngelsdorp et al., 2009; Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; Grab et al., 2019; Guimarães-Cestaro et al., 2020; Gregorc, 2020; Grant et al., 2021). Vários desses fatores estão relacionados com a expansão da agricultura, em especial, a intensificação no uso de pesticidas, o que tem afetado negativamente as abelhas, que podem ser contaminadas com esses pesticidas durante suas atividades de forrageio e podem levar o contaminante para as colônias, afetando assim toda a colmeia (Oldroyd, 2007; Gradish et al., 2019; Sgolastra et al., 2019).

O ciflumetofem é um pesticida de benzoil acetonitrila desenvolvido pela Otsuka AgriTechno Co., Ltd. (Sun et al., 2016) utilizado para o controle de ácaros pragas em plantações

de maçã, nozes, pepino, tomate, chás e plantas ornamentais (Takahashi et al., 2012; Chen et al., 2013). No Brasil, esse pesticida é indicado para combater ácaros em plantações de citros, café e maçã, culturas que são polinizadas por abelhas. Embora seja eficiente no controle das pragas alvo, resíduos de ciflumetofem permanecem no meio ambiente e seus metabólitos são frequentemente liberados em quantidades maiores do que seu composto original, sendo um potencial contaminante (Li et al., 2012; 2013). Sendo assim, é importante entender como *A. mellifera* pode ser afetada pelo ciflumetofem, principalmente os efeitos subletais em órgãos envolvidos nos processos de detoxificação, crescimento da colônia e com importantes funções no metabolismo do inseto, como o intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso, respectivamente.

O objetivo foi avaliar a hipótese que a exposição oral crônica à dose subletal de ciflumetofem causa danos às abelhas. Para isso, foram avaliadas a histopatologia e citotoxicidade no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera* com a finalidade de fornecer informações sobre os efeitos desse pesticida nesse importante polinizador.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Abelhas

Quadros de cria contendo pupas de *A. mellifera* foram coletados de cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O) e mantidos a 31 ± 2 ° C por 24h. As operárias adultas recém-emergidas foram coletadas e utilizadas para os experimentos.

2.2. Exposição crônica

As abelhas recém-emergidas (menos de 24h de emergência) foram alimentadas por 72h e 10 dias com a CL_{9/100} (5 ppm) do pesticida Okay® SC 200 g ingrediente ativo L-1 (Sugai Chemical Industry CP., LTD., Sukai, Japão) diluído em sacarose 50%. A CL_{9/100} (5 ppm) foi

obtida a partir dos testes de toxicidade no Capítulo 1. As abelhas do controle receberam apenas a solução de sacarose a 50% sem pesticida. Cada grupo de abelha foi composto por 10 indivíduos mantidos em potes de plástico de 250 mL. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 30 abelhas por concentração de ciflumetofem e o controle. Em cada pote plástico, o alimento foi ofertado, ad libitum, em um microtubo de 1,5 mL perfurado (Williams et al., 2013). Para cada grupo o microtubo contendo alimento foi substituído diariamente.

2.3. Microscopia de luz

Cinco operárias para cada tempo de exposição (72h e 10 dias), tratadas com 5 ppm de ciflumetofem e controle, foram imobilizadas a 4 °C por 3 minutos e transferidas para solução salina para insetos (0,1 M NaCl+0,2 M KH₂PO₄+0,2 M Na₂HPO₄) para que o intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso fossem dissecados e posteriormente transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12h a 5 °C. A seguir as amostras foram desidratadas em gradiente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Alemanha). Secções com 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina (20 min) e eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão).

2.3.1. Índice de lesão no intestino médio

Cinco secções por intestino médio de cada operária obtidas para microscopia de luz, como descrito acima, foram selecionadas aleatoriamente para avaliar o índice de lesão de órgãos de acordo com Bernet et al. (1999) e Grella et al. (2019), causado pelo ciflumetofem após exposição oral crônica. A soma de todas as alterações histológicas em cada intestino foi calculada por abelha (n= 5) com a equação $I_{org} = \sum alt (a \times w)$, onde $\sum alt$ é a soma das alterações, a é o valor da pontuação e w é o fator de importância (Bernet et al., 1999). As pontuações foram classificadas como: i) nenhuma ocorrência = 0, ii) ocorrência leve = 1, iii) ocorrência moderada = 2 ou iv) ocorrência grave = 3. As importâncias dos fatores foram classificadas como: i) dano

reversível = 1 (fragmentos de células eliminados, secreção apócrina), ii) dano geralmente reversível = 2 (vacuolização celular), e iii) dano irreversível = 3 (núcleo picnótico, dano em células regenerativas) (Grella et al., 2019).

2.4. Histoquímica

Algumas secções histológicas, não coradas, foram submetidas aos testes histoquímicos descritos a seguir.

2.4.1. Detecção e quantificação de proteínas

As secções histológicas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *A. mellifera* foram incubadas em mercúrio bromofenol (100 mL de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bromofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio) por 2 h e 15 min. Em seguida foram lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas com meio de montagem Entellan e lamínulas de 24 x 60 mm, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX53. As imagens obtidas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de cada abelha (n= 5) foram utilizadas para quantificação de proteínas de acordo com a intensidade de reação ao mercúrio de bromofenol utilizando o software ImageJ/FIJI. A intensidade da reação positiva para mercúrio de bromofenol foi medida por meio da análise da intensidade dos valores de escala de cinza das imagens (Urstadt, 2022). As imagens tiveram os valores de pixel convertidos da escala de cores RGB (red-vermelho, green-verde, blue-azul) para escala de cinza. Áreas de 32 x 32 pixels, para intestino médio e corpo gorduroso, e área de 100 x 100 pixels para glândula hipofaríngea, foram utilizadas para avaliar os valores de intensidade de escala de cinza em cinco regiões escolhidas aleatoriamente para cada abelha (n= 5).

2.5.2. Detecção e quantificação de polissacarídeos neutros e glicoconjugados

As amostras com cortes histológicos do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *A. mellifera* foram submetidas ao teste de ácido periódico-Schiff (PAS).

Brevemente, as amostras foram colocadas em ácido periódico 0,4% por 30 min, lavadas rapidamente em água destilada e transferidas para reativo de Schiff (Lillie, 1965) por 1 h no escuro. Por fim, lavadas em água corrente por 30 min, montadas, analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX60. As imagens obtidas do intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de cada abelha (n= 5) foram utilizadas para quantificação de carboidratos de acordo com a intensidade de coloração de PAS utilizando o software ImageJ/FIJI. A intensidade da reação positiva para PAS foi medida através da análise da intensidade dos valores de cinza das imagens (Urstadt, 2022) conforme descrito anteriormente (2.4.1).

2.5.3. Quantificação de lipídeos

As imagens obtidas dos trofócitos presentes no corpo gorduroso, submetidos ao teste com mercúrio de bromofenol, foram utilizadas para quantificação de lipídeos. Em cada uma das cinco imagens de cada abelha (n = 5) os dados foram obtidos utilizando o programa GIMP versão 2.10 (<https://www.gimp.org/>), com o auxílio da ferramenta de seleção por cor (Solomon, 2009). Utilizando essa ferramenta, a área preenchida por lipídeos foi selecionada, sendo que essa área não foi marcada pelo mercúrio de bromofenol e estava transparente, possibilitando a obtenção do valor da área preenchida por lipídeos em número de pixels.

2.6. Citotoxicidade

Cinco abelhas do grupo controle e cinco abelhas alimentadas com CL_{9/100} (5 ppm) de ciflumetofem por 72h e 10 dias foram dissecadas. O intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso foram transferidos para solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 e 0,2 M de sacarose por 4 h em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h, lavadas em tampão, desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.). Secções ultrafinas (60-90 nm de espessura) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrótomo Sorvall MT2-BMT2-B (Sorvall

Instruments, Wilmington, DE, USA), contrastadas com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.7. Estatística

Para o índice de lesão no intestino médio, a soma de todas as alterações histológicas, em cada intestino por abelha, foi analisada com teste t-Student usando o programa GraphPadPrism v.7.0.

Para comparar os níveis de carboidratos e proteínas entre tratamento (5 ppm) e controle no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso das abelhas após 72h e 10 dias de exposição ao ciflumetofem foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Este teste não paramétrico foi escolhido devido à não atendimento das suposições de normalidade e homogeneidade de variância nos dados obtidos de intensidade dos valores de cinza das imagens.

Para realizar a quantificação de lipídeos nos trofócitos do corpo gorduroso, os valores de pixels obtidos foram submetidos ao teste t-Student com nível de significância de 5%, utilizando o software R versão 4.2.2 (R Core Team, 2020) e os pacotes stats e ggplot2 (Wickham, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia

3.1.1. Intestino médio

O intestino médio das abelhas controle é formado por um epitélio composto de uma única camada de células colunares com núcleos elípticos ricos em cromatina descondensada, citoplasma com presença de pequenos vacúolos e superfície apical mostrando borda estriada bem desenvolvida (Figs. 1A e 1C).

O epitélio do intestino médio das abelhas tratadas com ciflumetofem (5 ppm), após 72h (Fig. 1B) e 10 dias (Fig. 1D) apresentaram células digestivas com intensa vacuolização citoplasmática e fragmentação celular.

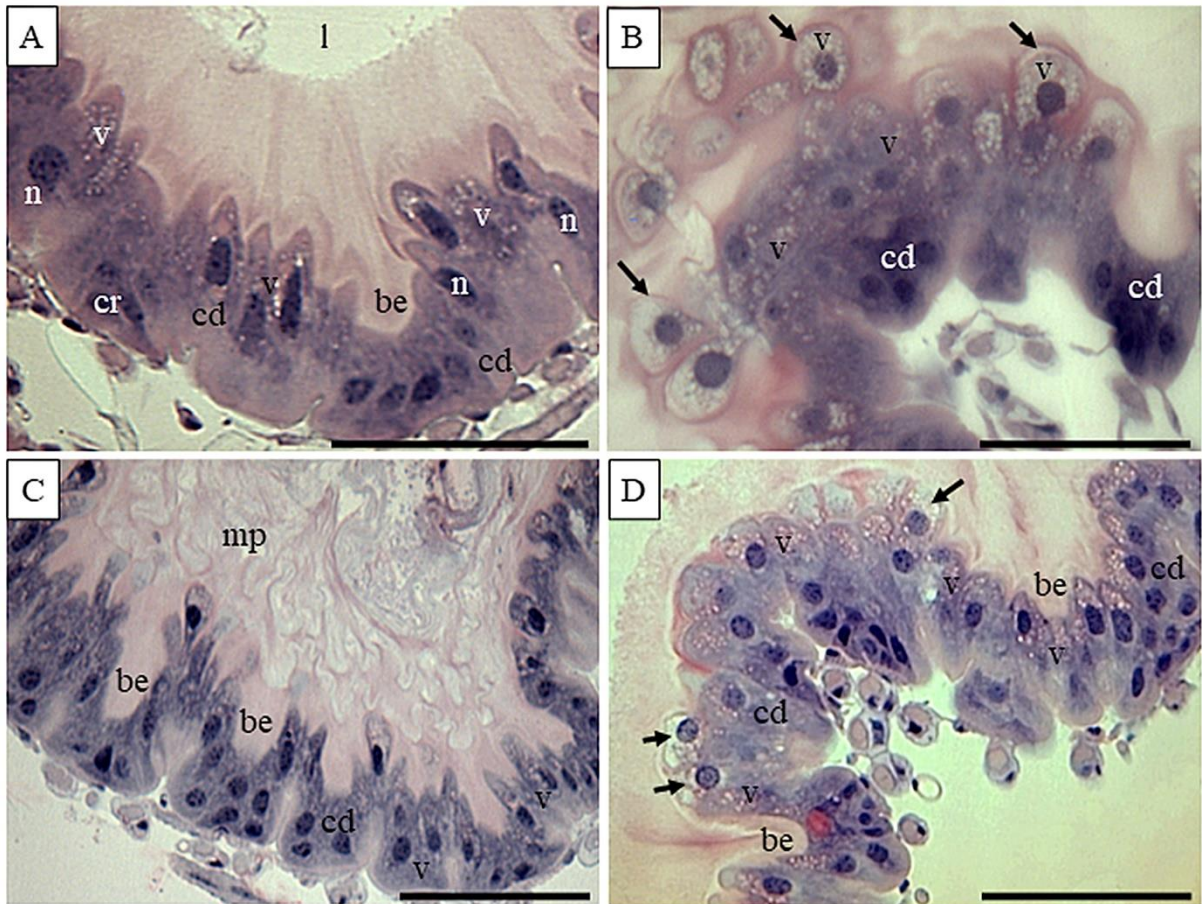


Figura 1. Micrografias de luz do intestino médio de *Apis mellifera*. A) Epitélio intestinal de abelha controle (72h) apresentando uma única camada de células digestivas colunares (cd), borda estriada (be) bem desenvolvida, ninhos de células regenerativas (cr) na porção basal, lúmen (l) e presença de alguns pequenos vacúolos (v). B) Epitélio intestinal de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h mostrando a presença de muitos vacúolos no citoplasma das células digestivas e fragmentos celulares (seta). C) Epitélio intestinal de abelha controle (10 dias). D) Epitélio intestinal de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 10 dias mostrando a presença de muitos vacúolos no citoplasma das células digestivas e fragmentos celulares (seta). Barra de escala: 10 μ m.

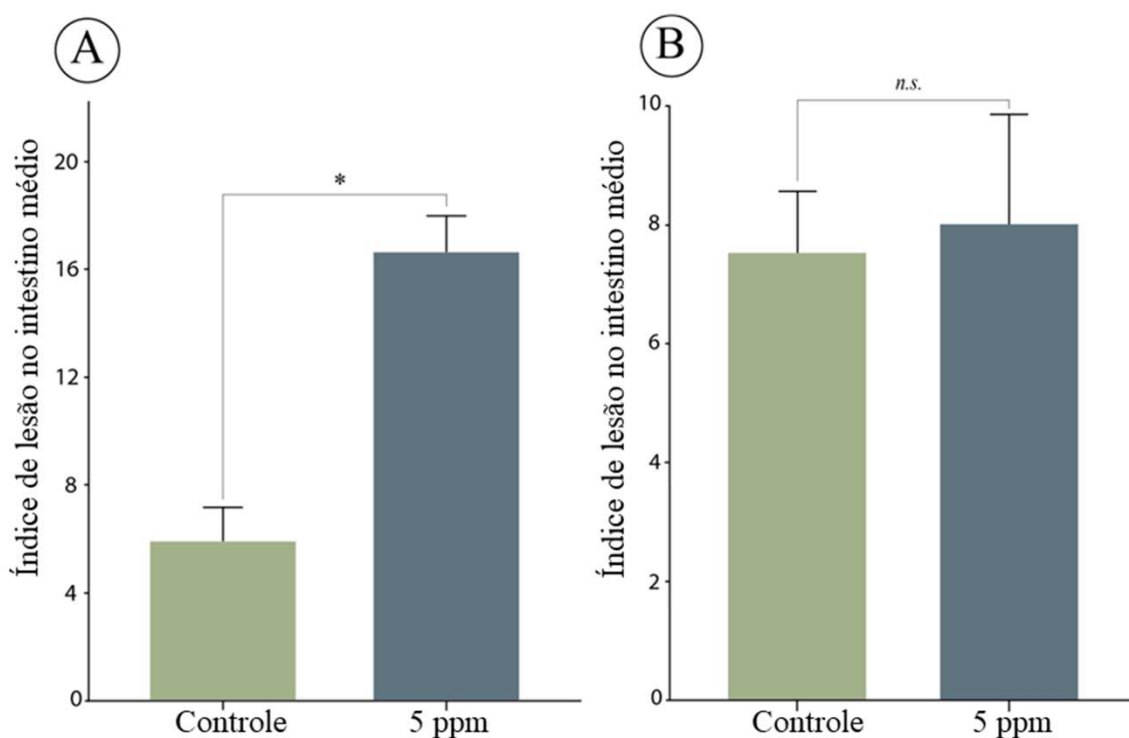


Figura 2. Índice de lesão no intestino médio de *Apis mellifera* exposta à 5 ppm de ciflumetofem por 72h (A) e 10 dias (B). Asterisco (*) indica diferença estatística entre o tratamento e o controle, n.s. indica ausência de diferença estatística.

As análises de índice de lesão no intestino médio revelaram a ocorrência de danos nas abelhas expostas ao ciflumetofem por 72h ($t_{1,8} = 13,53$; $p < 0,0001$; Fig. 2A), enquanto naquelas abelhas expostas por 10 dias ao pesticida, as diferenças detectadas não foram significativas quando comparadas com o controle ($t_{1,8} = 0,55$; $p = 0,60$; Fig. 2B).

3.1.2. Glândula hipofaríngea

As glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* apresentam ácinos formados por várias células secretoras. Cada célula secretora apresentou núcleo de formato irregular com cromatina descondensada, aparato terminal que preenche grande parte do citoplasma, presença de secreção e canalículo coletor, tanto no controle (Figs. 3A e 3C), como naquelas tratadas com ciflumetofem por 72h (Fig. 3B) e 10 dias (Fig. 3D). As glândulas hipofaríngeas das abelhas tratadas com ciflumetofem por 72h e 10 dias, apresentaram o aparato terminal cheio de secreção, formando sáculos evidentes (Fig. 3B, D).

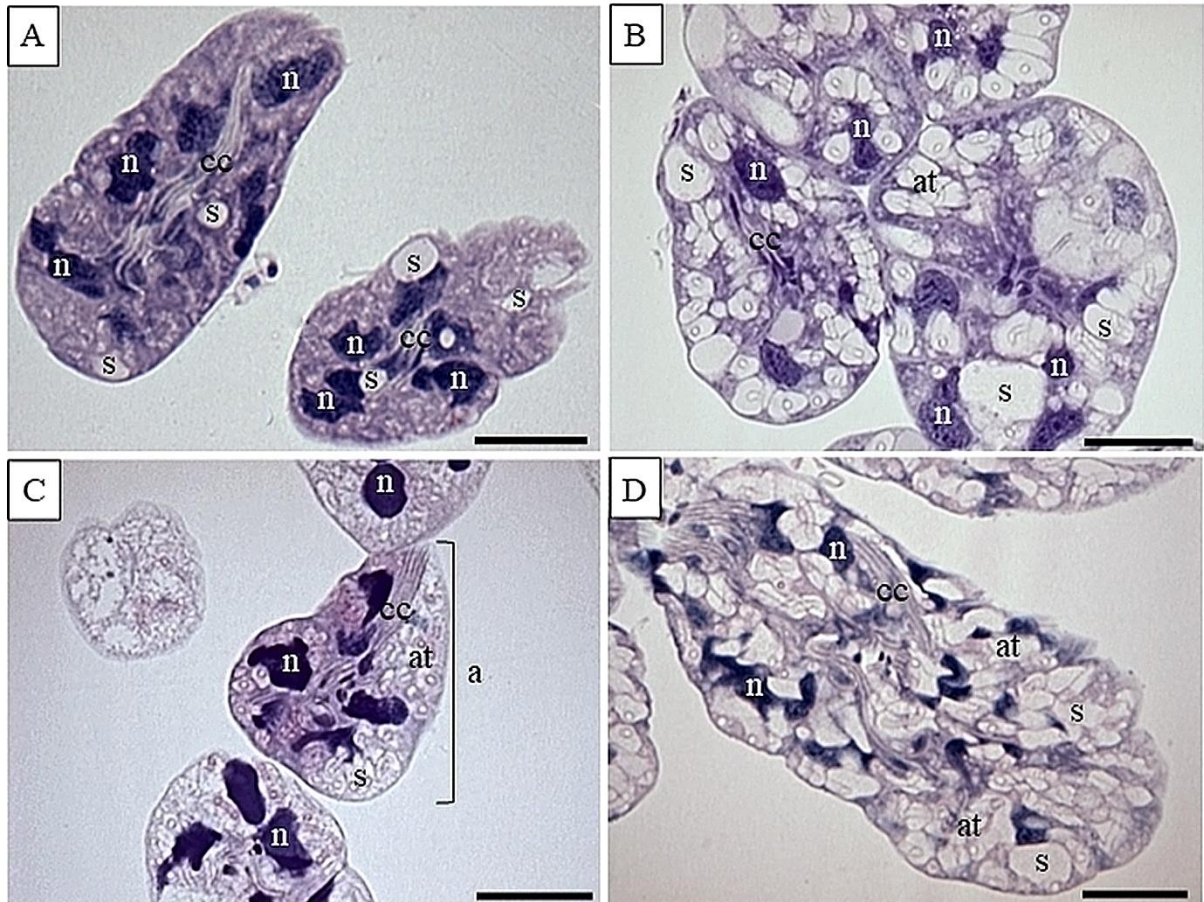


Figura 3. Micrografias de luz de glândula hipofaríngea de *Apis mellifera*. A) Ácinos de abelha controle (72h) formado por várias células secretoras, cada uma com um núcleo (n), pouca secreção (s) e canalículo coletor (cc). B) Ácinos de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h apresentando aparato terminal (at) bem evidente com bastante secreção (s) em seu interior. C) Ácinos (a) de abelha controle (10 dias de vida). D) Ácinos de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 10 dias apresentando aparato terminal bem evidente com bastante secreção (s) em seu interior. Barra de escala: 5 μ m.

3.1.3. Corpo gorduroso

No corpo gorduroso das abelhas foram observados dois tipos celulares: os trofócitos e os enócitos. Os trofócitos possuem forma variável, são preenchidos por gotículas lipídicas, núcleo com cromatina condensada e vários nucléolos. Os enócitos, por sua vez, possuem forma elipsoide com limites bem definidos e núcleo esférico centralizado com vários nucléolos. Não foram observadas diferenças histopatológicas entre o controle e as abelhas alimentadas com 5 ppm de ciflumetofem por 72h e 10 dias (Fig. 4A-D).

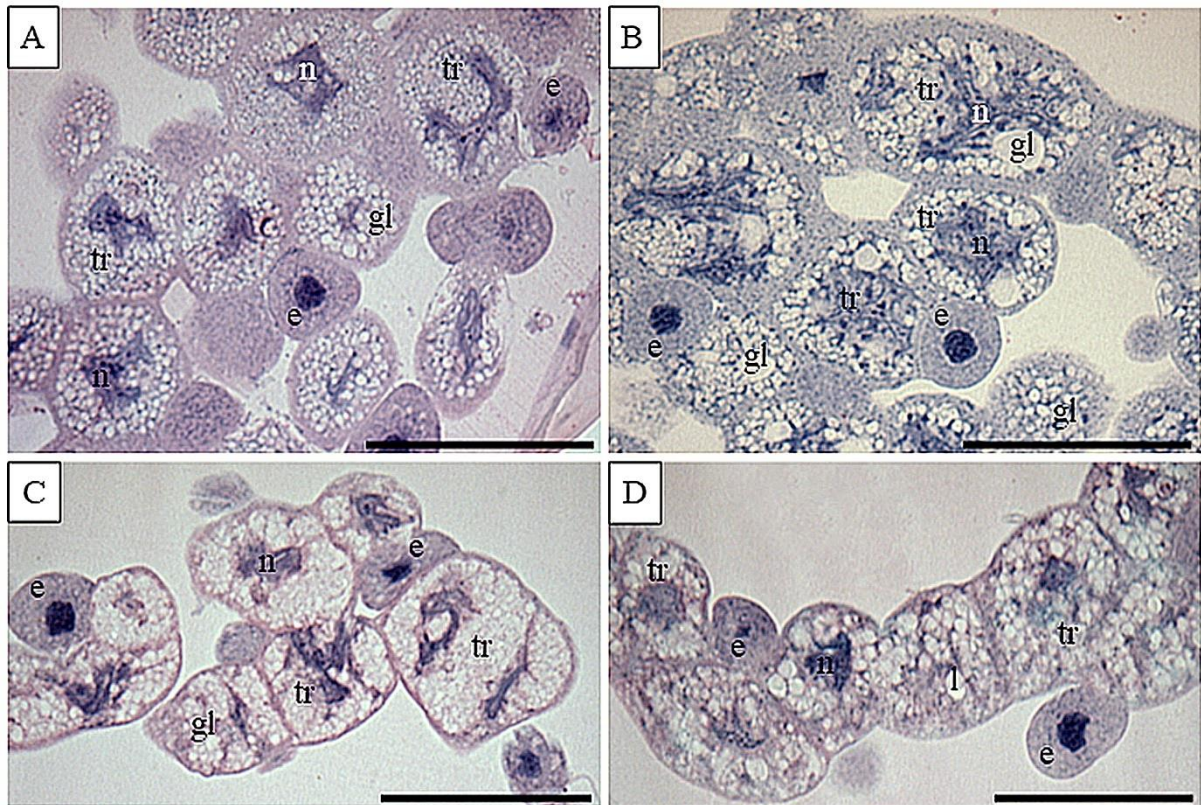


Figura 4. Micrografias de luz de corpo gorduroso de *Apis mellifera* mostrando os trofócitos (tr) com formato variável preenchido por gotículas lipídicas (gl), núcleos ramificados (n) e presença de enócitos (e) com forma elipsoide e núcleo (n) esférico centralizado. A) Controle 72h. B) Corpo gorduroso de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h. C) Controle 10 dias. D) Corpo gorduroso de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 10 dias. Barra de escala: 5 μ m.

3.2. Histoquímica

O teste histoquímico para detecção de proteínas (mercúrio de bromofenol) foi positivo no intestino médio (Fig. 5A, B), glândula hipofaríngea (Fig. 5C, D) e corpo gorduroso (Fig. 5E, F), tanto no controle (Fig. 5A, C, E), como nas abelhas tratadas com 5 ppm de ciflumetofem, em 72h (Fig. 5B, D, F) e 10 dias (não mostrado).

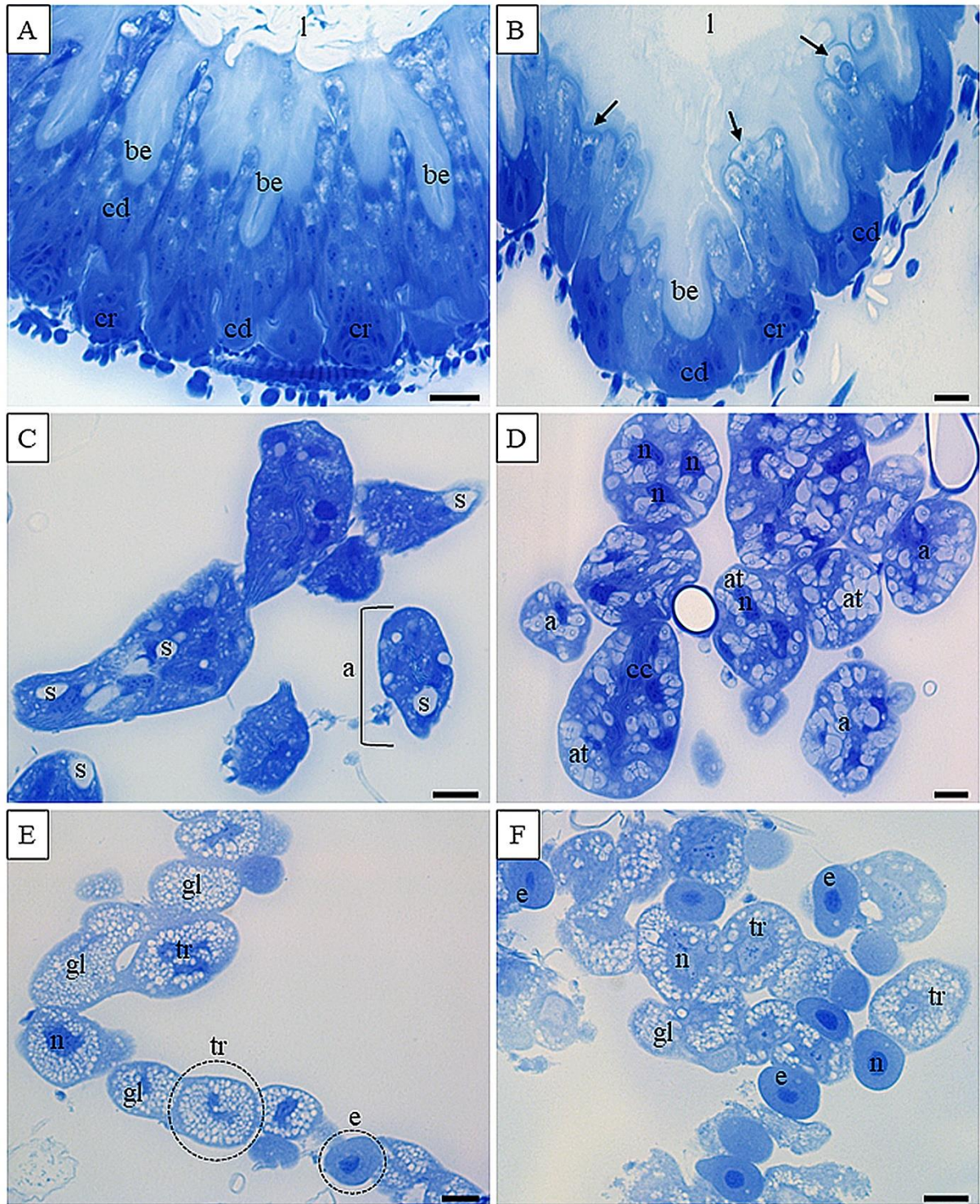


Figura 5. Micrografias de luz do intestino médio (A, B), glândula hipofaríngea (C, D) e corpo gorduroso (E, F) de *Apis mellifera* positivas para proteínas usando mercúrio de bromofenol. Coluna da esquerda: controle. Coluna da direita: abelhas expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 72h. l: lúmen, be: borda estriada, cd: célula digestiva, cr: célula regenerativa, seta: fragmentos celulares, s: secreção, a: ácino, cc: canal coletor, at: aparato terminal, n: núcleo, gl: gotículas lipídicas nos trofócitos, tr: trofócitos, e: enócitos. Barra de escala: 20 μ m.

A intensidade da reação ao mercúrio de bromofenol, que indica quantidade de proteínas, após 72h de tratamento, foi maior no intestino médio ($\chi^2 = 3,857$, $df = 1$, $p = 0,04$) das abelhas expostas ao ciflumetofem, menor nas glândulas hipofaríngeas ($\chi^2 = 3,857$, $df = 1$, $p = 0,04$) e similar no corpo gorduroso ($\chi^2 = 2,333$, $df = 1$, $p = 0,12$) (Fig. 6), quando comparadas ao controle.

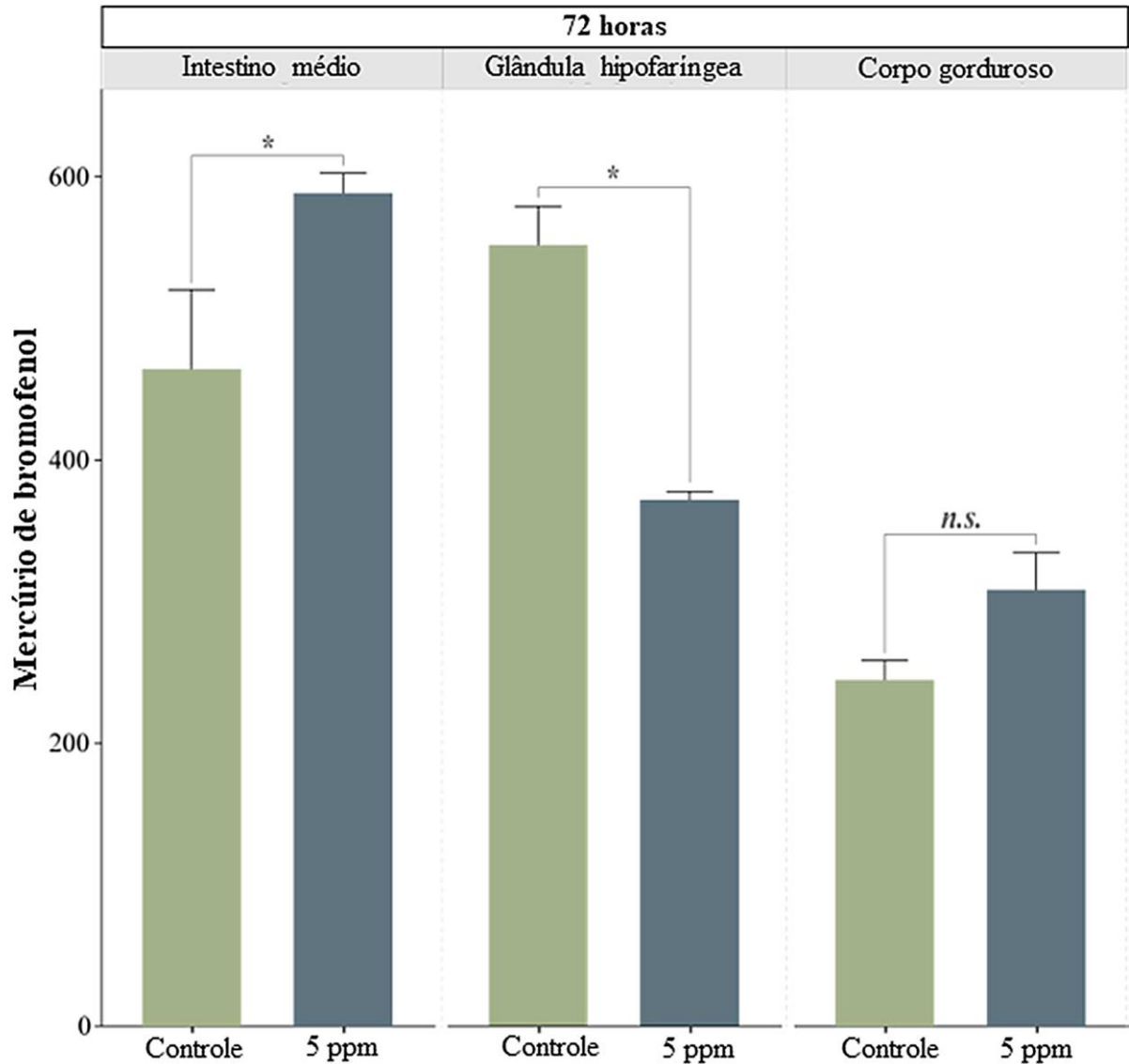


Figura 6. Intensidade da reação positiva pela técnica histoquímica de mercúrio de bromofenol no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *Apis mellifera* expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 72h e respectivos controles. Asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) e n.s. indica ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

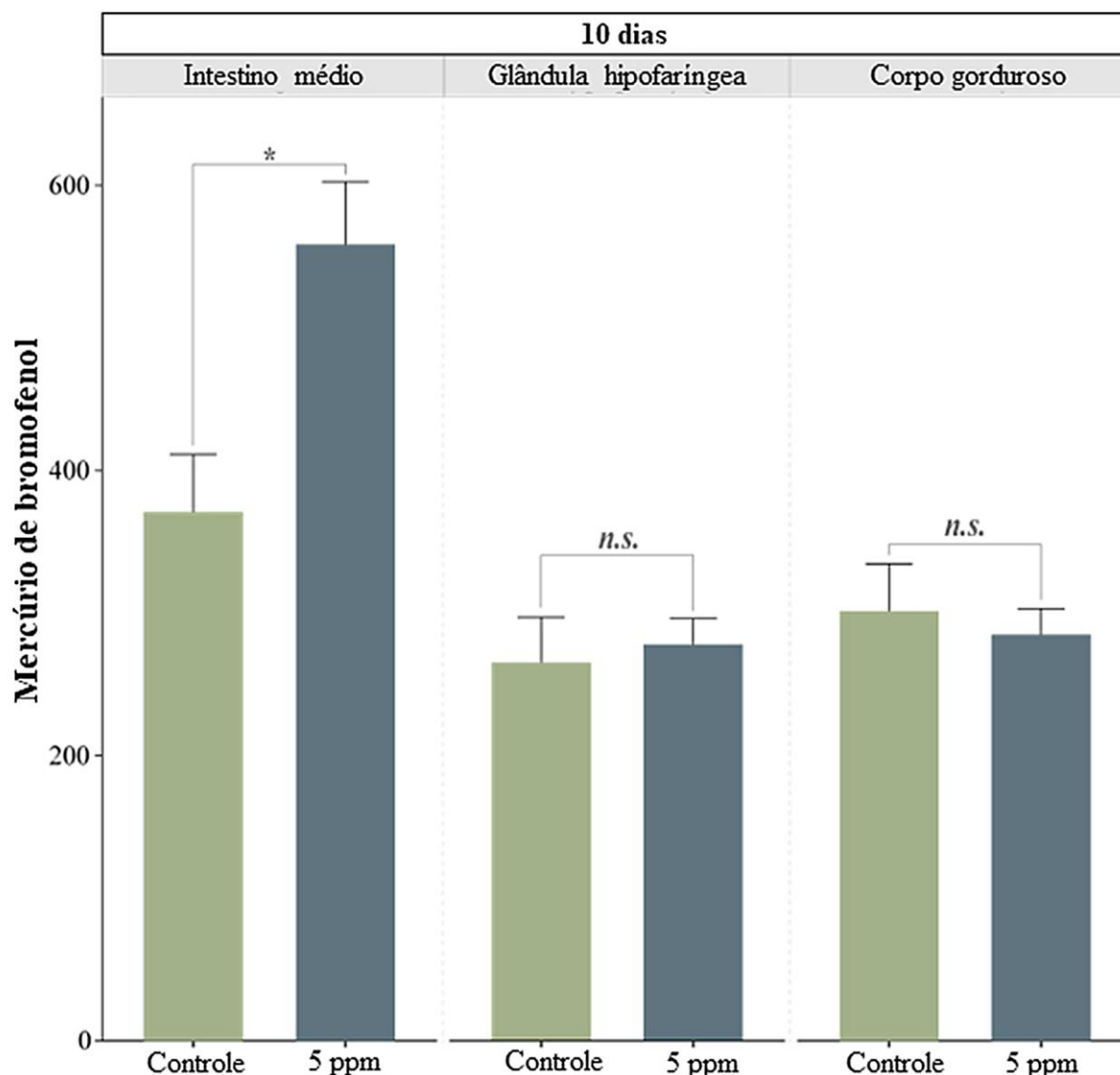


Figura 7. Intensidade da reação positiva pela técnica histoquímica de mercúrio de bromofenol no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de operárias de *Apis mellifera* expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 10 dias e respectivos controles. Asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) e n.s. indica ausência de diferenças estatística ($p > 0,05$).

Nas abelhas avaliadas por 10 dias, a intensidade da reação ao mercúrio de bromofenol foi maior no intestino médio das abelhas expostas ao ciflumetofem ($\chi^2 = 3,857$, $df = 1$, $p = 0,04$) e similares ao controle nas glândulas hipofaríngeas ($\chi^2 = 0,428$, $df = 1$, $p = 0,51$) e no corpo gorduroso ($\chi^2 = 0,428$, $df = 1$, $p = 0,51$) (Fig. 7) quando comparadas ao controle.

O teste histoquímico para detecção de carboidratos (PAS) também foi positivo no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso, tanto no controle, como nas abelhas tratadas com ciflumetofem, em 72h e 10 dias (Fig. 8A-F).

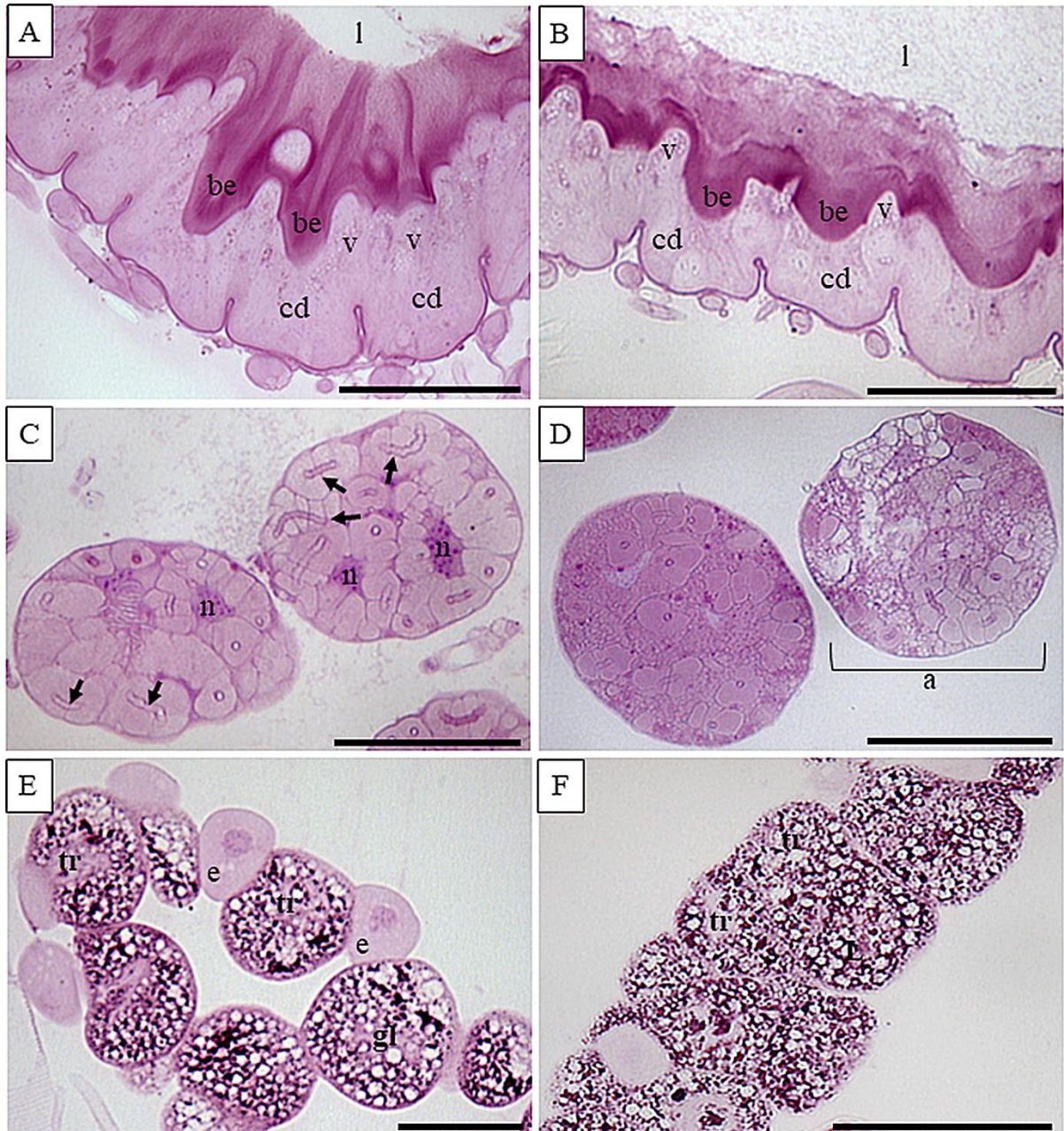


Figura 8. Micrografias de luz do intestino médio (A, B), glândula hipofaríngea (C, D) e corpo gorduroso (E, F) de *Apis mellifera* submetidas ao teste de ácido periódico-Schiff. Coluna da esquerda: controle. Coluna da direita: abelhas expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 10 dias. l: lúmen, cd: célula digestiva, be: borda estriada, v: vacúolos, n: núcleos, a: ácino, setas: canalículo do aparato terminal, tr: trofócitos, e: enócito, gl: gotículas lipídicas. Barra de escala: 5 μ m.

A intensidade da reação PAS em 72h de exposição ao ciflumetofem foi similar entre controle e tratamento no intestino médio ($\chi^2 = 0,102$, $df = 1$, $p = 0,74$), glândula hipofaríngea

($\chi^2 = 0,025$, $df = 1$, $p = 0,87$) e corpo gorduroso ($\chi^2 = 0,102$, $df = 1$, $p = 0,74$) (Fig. 9), assim como em 10 dias de exposição ao ciflumetofem no intestino médio ($\chi^2 = 0,047$, $df = 1$, $p = 0,82$), glândula hipofaríngea ($\chi^2 = 1,190$, $df = 1$, $p = 0,27$) e corpo gorduroso ($\chi^2 = 0,428$, $df = 1$, $p = 0,51$) (Fig. 10), quando comparadas ao controle.

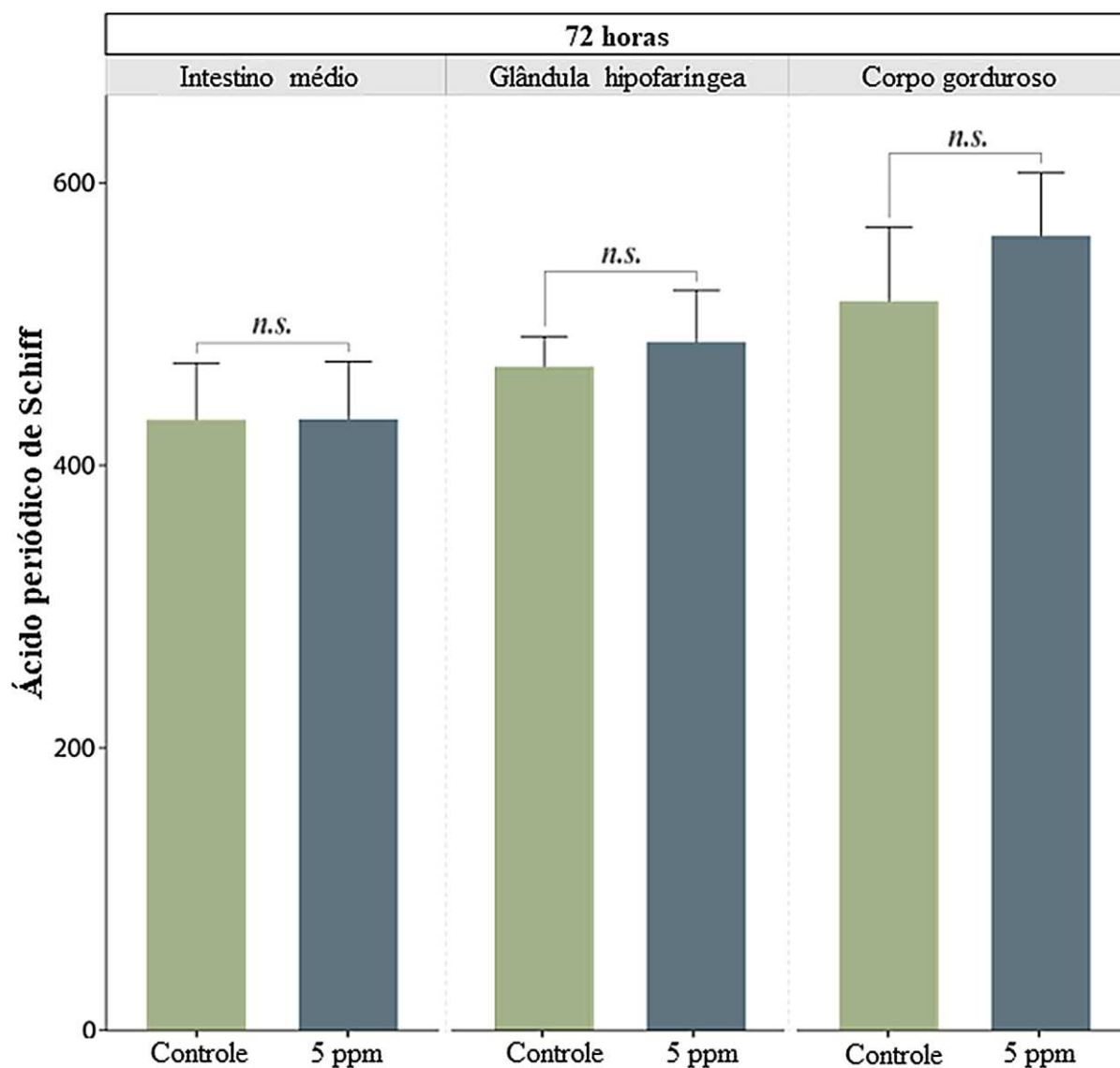


Figura 9. Intensidade da marcação positiva da técnica histoquímica do ácido periódico-Schiff (PAS) no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *Apis mellifera* em 72h de exposição a 5 ppm de ciflumetofem e respectivos controles. n.s. indica ausência de diferenças estatística ($p > 0,05$).

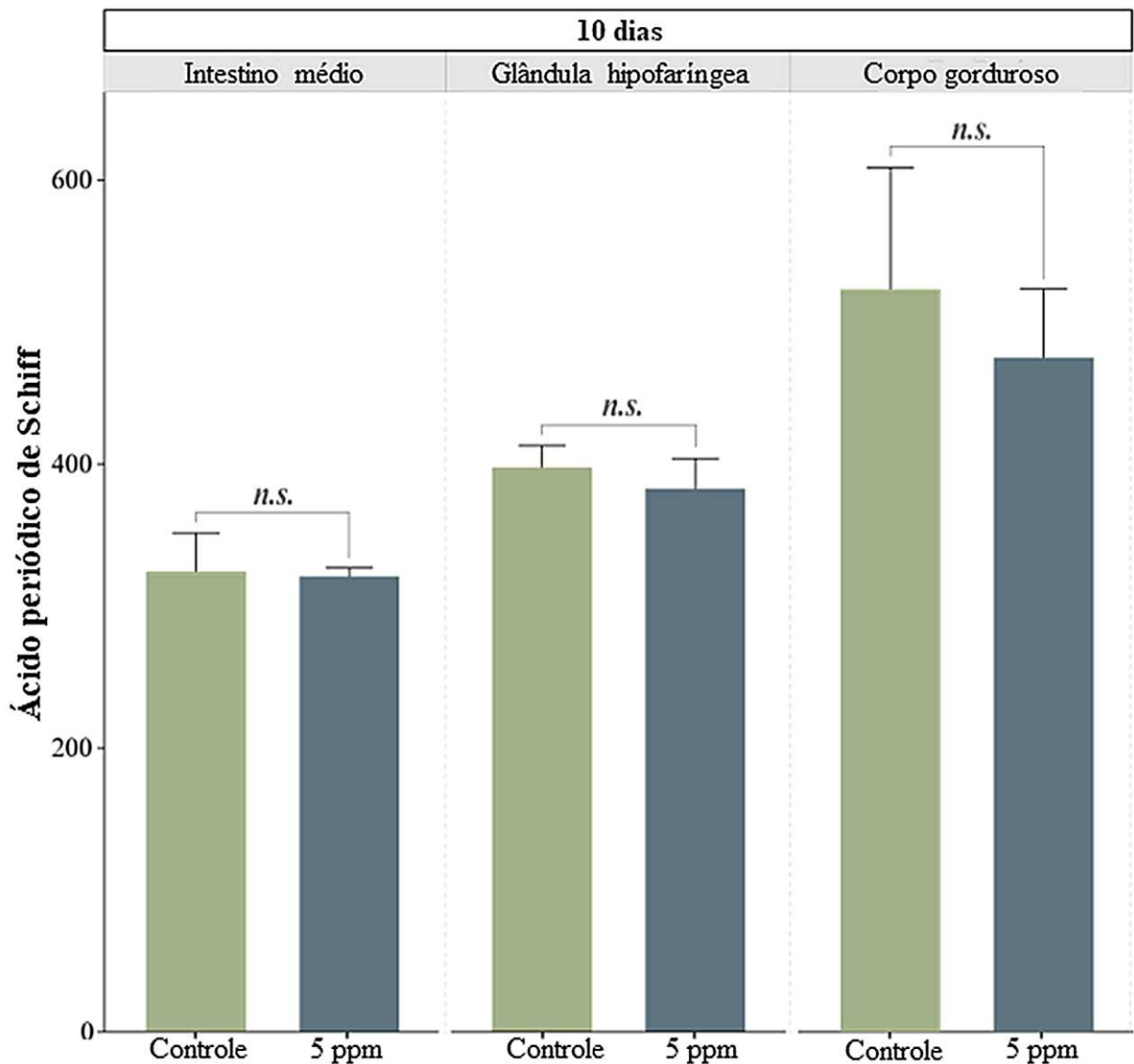


Figura 10. Intensidade da marcação positiva da técnica histoquímica do ácido periódico-Schiff (PAS) no intestino médio, glândula hipofaríngea e corpo gorduroso de *Apis mellifera* em 10 dias de exposição a 5 ppm de ciflumetofem e respectivos controles. n.s. indica ausência de diferenças estatística ($p > 0,05$).

Nos trofócitos de operárias de *A. mellifera*, a quantidade de lipídeos foi similar entre as abelhas controle e as tratadas com 5 ppm de ciflumetofem por 72h ($t_{1,4} = 2,11$, $p = 0,10$) e 10 dias ($t_{1,4} = 2,35$, $p = 0,07$) (Fig. 11).

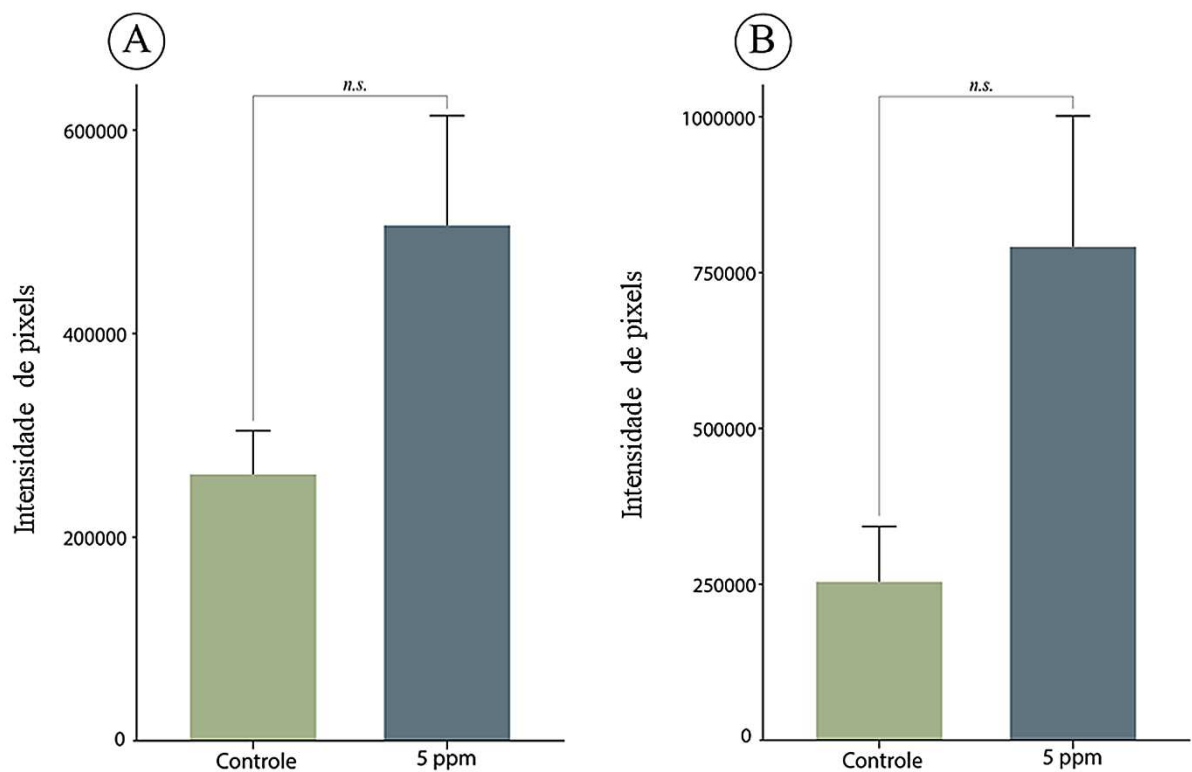


Figura 11. Quantificação de lipídeos no corpo gorduroso de *Apis mellifera* expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 72h (A) e 10 dias (B) e respectivos controles. n.s. indica ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

3.3. Citotoxicidade

3.3.1. Intestino médio

Nas abelhas operárias controle, as células digestivas do intestino médio apresentam labirinto basal bem desenvolvido, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (Fig. 12A), mitocôndrias e alguns vacúolos (Fig. 12C), núcleo com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo bem desenvolvido (Fig. 12A, 12C), e alta densidade de microvilosidades na superfície apical (Fig. 12C).

Nas abelhas operárias alimentadas com 5 ppm de ciflumetofem, por 72h e 10 dias, as células digestivas apresentaram algumas protrusões apicais com presença de material granular fino, restos membranosos, vesículas e algumas contendo núcleo (Fig. 12B, 12D). Algumas células apresentaram ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático.

3.3.2. Glândula hipofaríngea

As células secretoras das glândulas hipofaríngeas das operárias adultas do controle com 72h e 10 dias, apresentaram aparato terminal com alguma secreção em seu interior, formando sáculos dilatados e citoplasma com pequenos grânulos de secreção elétron-densos (Fig. 13A, C).

As glândulas hipofaríngeas das operárias expostas a 5 ppm de ciflumetofem por 72h (Fig. 13B), não apresentaram alterações ultraestruturais em relação ao controle. Nas operárias expostas por 10 dias ao pesticida, as células secretoras apresentaram pequenos grânulos de secreção elétron-densos em todo o citoplasma, alguns grânulos maiores elétron-lúcidos e pouca secreção no aparato terminal (Fig. 13D).

3.3.3. Corpo Gorduroso

No corpo gorduroso, os trofócitos não apresentaram diferenças ultraestruturais entre tratamento e controle, com a membrana plasmática contendo invaginações formando um labirinto periférico e citoplasma rico em gotículas lipídicas com algumas inclusões elétron densas em seu interior (Fig. 14A, B).

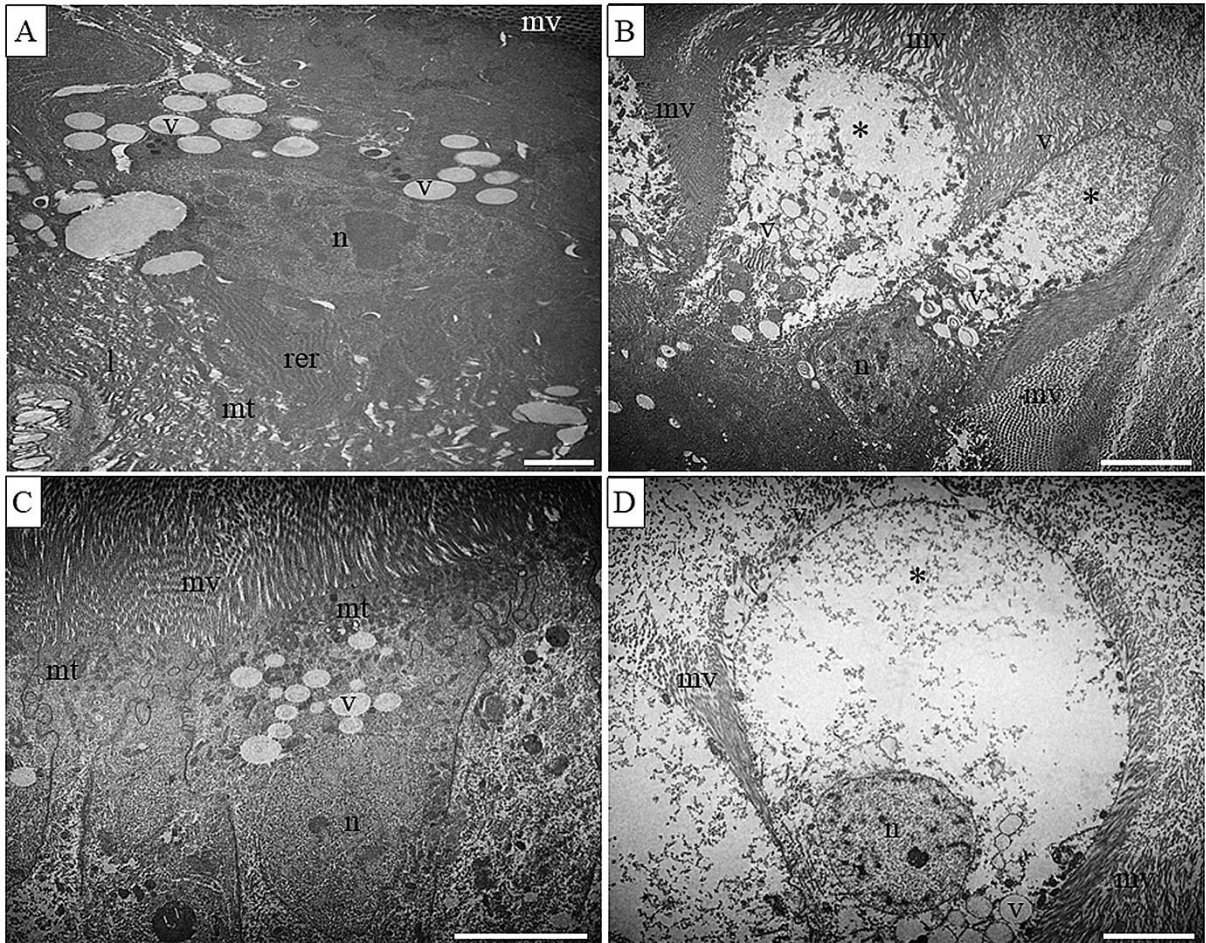


Figura 12. Micrografias eletrônicas de transmissão do intestino médio de *Apis mellifera*. Célula digestiva de operária adulta controle: 72h (A) e 10 dias (C) mostrando labirinto basal (L), retículo endoplasmático rugoso (rer) bem desenvolvido, núcleo (n), citoplasma com alguns vacúolos (v) e mitocôndrias (mt) e abundância de microvilosidades (mv) na superfície apical. Célula digestiva do intestino médio de abelha exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h (B) e 10 dias (D) mostrando células sem organelas em seu interior (*) e com presença de material granular fino, poucas células nucleadas (n), ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático, muitos vacúolos (v) no citoplasma e microvilosidades (mv) em sua superfície apical. Barra de escala: A) 2 μ m, B-D) 5 μ m.

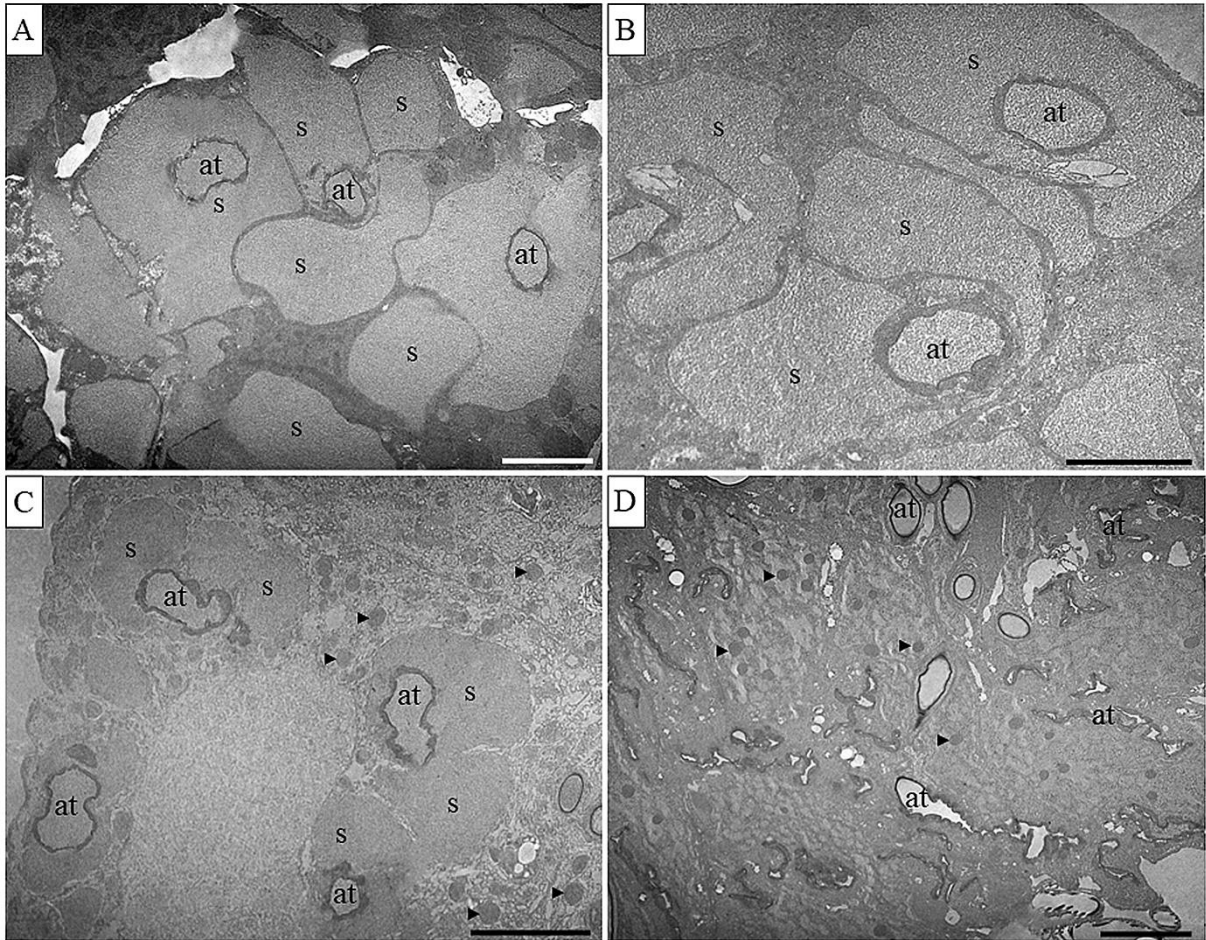


Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão das glândulas hipofaríngeas de operárias adultas de *Apis mellifera*. A) Abelha controle com 72h (A) e 10 dias de idade (C) mostrando células secretoras com aparato terminal (at) repleto de secreção (s) formando sáculos bem desenvolvidos e pequenos grânulos secretores elétron-densos (cabeça de seta) no citoplasma. B) Abelha operária exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h e 10 dias (D) mostrando células secretoras com pequenos grânulos de secreção elétron-densos (cabeça de seta) em todo o citoplasma. Barras de escala: A, C, D) 5 μ m, B) 2 μ m.

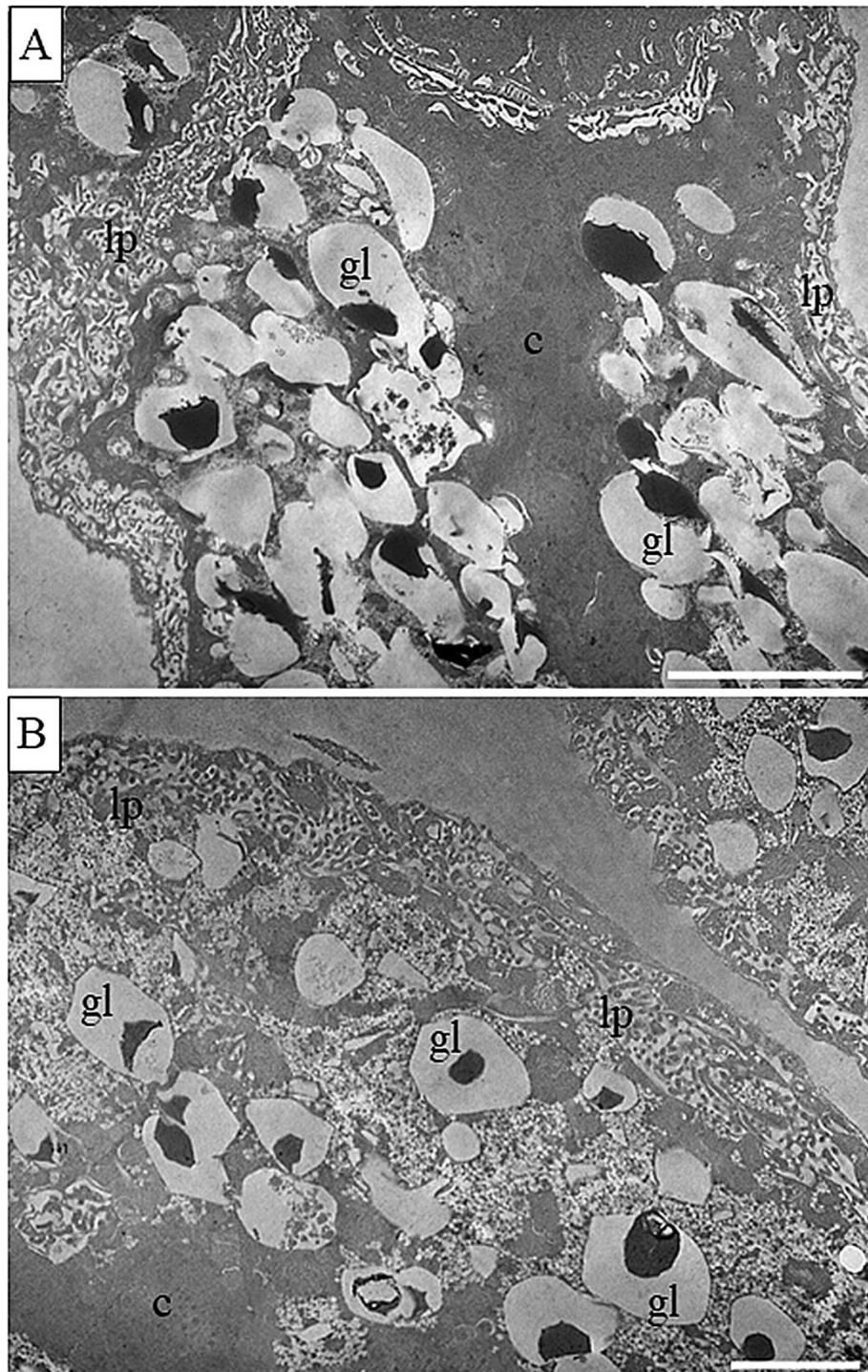


Figura 14. Micrografias eletrônicas de transmissão de trofócitos do corpo gorduroso de *Apis mellifera* mostrando membrana plasmática com invaginações formando um labirinto periférico (lp) e citoplasma (c) rico em gotículas (gl) com algumas inclusões elétron-densas em seu interior. A) Controle, B) Abelha operária adulta exposta a 5 ppm de ciflumetofem por 72h. Barra de escala: A) 50 μ m, B) 2 μ m.

4. DISCUSSÃO

O intestino médio das abelhas expostas à concentração subletal de 5 ppm de ciflumetofem por 72h e 10 dias apresenta vacuolização citoplasmática e fragmentação celular, similares àquelas observadas em abelhas após exposição à concentração letal CL_{50} de outros pesticidas, incluindo imidacloprido (Carneiro et al., 2023), lambda-cialotrina (Arthidoro de Castro et al., 2020), espiromesifen (Serra et al., 2021) e azoxistrobina (Serra et al., 2023), indicando que o ciflumetofem causa danos ao intestino médio da abelha em concentração subletal. Vacuolização citoplasmática tem sido frequentemente observada após exposição a produtos químicos (Aki et al., 2012), sendo indicativo de autofagia, mecanismo celular que pode ser ativado em resposta a privação de nutrientes e estresse celular (Zhang et al., 2017; Mercer et al., 2018). A fragmentação celular, como aqui observado, ocorre quando as células sofrem danos que as tornam incapazes de realizar suas funções (Grella et al., 2019) e, portanto, são eliminadas e substituídas por novas células digestivas resultantes da diferenciação de células regenerativas presentes no intestino médio (Batista et al., 2020).

Os danos histopatológicos no intestino médio causados pela concentração subletal do ciflumetofem foram confirmados pelo alto de índice de lesão no órgão após 72h de exposição a 5 ppm, revelando um efeito em curto prazo pelo pesticida. Entretanto, após 10 dias de exposição ao pesticida, não ocorrem evidências quantitativas de danos ao epitélio do intestino médio de *A. mellífera*, indicando um possível mecanismo de recuperação do órgão, que pode ser mediado por enzimas detoxificantes produzidas pelas células digestivas e pela degradação de organelas danificadas por autofagia. O processo de detoxificação no intestino dos insetos ocorre pela ação de enzimas que são produzidas para proteger as células de produtos químicos e efeitos físicos (Rand et al., 2015). Algumas dessas enzimas são: glicosiltransferases, citocromos P450, carboxilases, esterases e glutathione-S-transferases (Li et al., 2007; Meech et al., 2012). Essas enzimas degradam substâncias tóxicas e induzem a resistência a inseticidas

por meio da regulação da expressão gênica (Bull e Whitten, 1972; Scott et al., 1999; Li et al., 2007; Rodolphe et al., 2008), exceto a glutathione-S-transferase, que age catalisando a conjugação de componentes eletrófilos com o grupo tiol da glutathione reduzida (Enayati et al., 2005). A autofagia, por sua vez, tem, principalmente um papel pró-sobrevivência, mantendo a homeostase celular e fornecendo um mecanismo de controle de qualidade intracelular para impedir o acúmulo de proteínas mal dobradas, organelas danificadas e estresse celular que podem perturbar a função da célula (Wirawan et al., 2012). Assim, ambos os processos celulares podem ser responsáveis pela recuperação do intestino médio após longo período de exposição à concentração subletal de ciflumetofem.

A intensidade da reação de mercúrio de bromofenol foi diferente no intestino médio em 72h e em 10 dias de exposição a 5 ppm de ciflumetofem em relação ao controle. A maior quantidade de proteínas no intestino médio das abelhas tratadas, indicado pela histoquímica, provavelmente se deve a ativação de processos de detoxificação para tentar bloquear ou mitigar os danos causados pelo pesticida e manter as funções do órgão.

Os resultados observados em relação a citotoxicidade causada no intestino médio pela concentração subletal de ciflumetofem, indicam degeneração celular assim como observado nas células do intestino médio de operárias de *A. mellifera* expostas ao fungicida iprodione (Carneiro et al., 2020) e ao pesticida espiromesifeno (Serra et al., 2021), compostos que não causam mortalidade na abelha. Essa degeneração pode ser devido a processos de morte celular (autofagia e necrose) que estão ocorrendo no intestino médio. A autofagia é um processo em que componentes intracelulares como proteínas anormais, organelas danificadas, patógenos e outros componentes celulares são degradados via lisossomo (Lu et al., 2022), sendo fundamental para manter a homeostase celular, mas podendo levar também a morte celular (morte celular autofágica), em caso de esgotamento dos principais reguladores que incluem várias proteínas apoptóticas (Wirawan et al., 2012). A necrose no intestino médio de insetos,

por sua vez, é um processo em que as organelas são removidas para o lúmen e as células epiteliais sofrem lise (Rost-Roszkowska 2008). A eliminação de células digestivas para o lúmen é um processo que ocorre normalmente no intestino médio, contudo, alguns produtos químicos podem aumentar a morte celular, podendo comprometer a digestão e absorção de nutrientes (Carneiro et al., 2020; Catae et al., 2014). Portanto, pode ser sugerido que o ciflumetofem gera estresse celular e ativa processos de morte celular no intestino médio de operárias de *A. mellifera* causando danos nesse órgão.

A morfologia das glândulas hipofaríngeas das abelhas tratadas com 5 ppm de ciflumetofem, tanto em 72h de exposição, como em 10 dias, apresentou o aparato terminal repleto de secreção formando sáculos bem evidentes, o que não ocorre nas glândulas hipofaríngeas das abelhas do controle. A glândula hipofaríngea das abelhas operárias tem sua atividade regulada por feromônios das larvas e da glândula mandibular da rainha (Peters et al., 2010), pela quantidade de pólen consumida (Hrassnigg e Crailsheim, 1998), idade e função da abelha na colônia (Deseyn e Billen, 2005; Elaidy, 2014) e pode ser regulada de acordo com a necessidade de alimentação das larvas (Free, 1961). Nesse sentido, é importante destacar que nas condições do experimento aqui realizado, não houve presença de rainha ou de larvas e a alimentação foi ofertada da mesma forma no controle e no tratamento, exceto que as abelhas tratadas receberam a solução de sacarose com 5 ppm de ciflumetofem e as abelhas do controle receberam apenas a solução de sacarose, sem a presença do pesticida. Portanto, pode ser sugerido que o ciflumetofem interfere na regulação da síntese de secreção da glândula hipofaríngea, induzindo o acúmulo de substâncias sintetizadas dentro das células, assim como proposto por Faight et al. (2018) com exposição ao herbicida glifosato. Acúmulo de secreção pode inibir a síntese proteica na célula secretora devido a um mecanismo de feedback negativo, onde as glândulas poderiam iniciar a produção de proteínas se fossem menores que um tamanho limite (o que ocorre quando há liberação de secreção através dos ductos para a boca) e

interrompem a produção de proteínas se as glândulas forem maiores que um limite superior (Huang et al., 1989). Portanto, o fato de haver maiores quantidades de secreção nas células secretoras da glândula hipofaríngea das abelhas tratadas com ciflumetofem podem indicar alterações no desenvolvimento dessa glândula, o que pode afetar toda a colônia.

A ultraestrutura da glândula hipofaríngea, em 72h de exposição a 5 ppm de ciflumetofem é similar ao controle, o que pode ocorrer devido ao curto período de exposição e baixa concentração do pesticida. Contudo, em 10 dias, houve diferença entre o controle e o tratamento, com a ausência de secreção no interior do aparato terminal das abelhas expostas a 5 ppm de ciflumetofem, indicando uma baixa atividade de secreção na glândula hipofaríngea. Quando as operárias são recém-emergidas, as glândulas hipofaríngeas ainda não possuem atividade secretora, mas por volta de 6-12 dias de idade, essa glândula atinge seu tamanho máximo e os ácinos estão no estado hipertrofiado com maior atividade secretora (Qin et al., 2022). Quando as abelhas começam a forragear, por volta da terceira semana de vida (21 dias em diante), o tamanho dos ácinos e a atividade secretora da glândula hipofaríngea diminuem (Moritz e Crailsheim 1987, Crailsheim e Stolberg 1989). Portanto, os resultados aqui obtidos, pouca secreção tanto no aparato terminal como no citoplasma das células, indicam que a concentração subletal de ciflumetofem pode induzir a um forrageio precoce, assim como também ocorre nas abelhas tratadas com hormônio juvenil ou seus análogos (Jaycox et al., 1974; 1976; Robinson 1985; 1987; Chang et al., 2015). O forrageio precoce é considerado um efeito subletal que pode ter como consequência a mortalidade massiva de larvas e reduzir severamente o desenvolvimento da próxima geração de abelhas operárias (Thompson et al., 2007). Além disso, abelhas induzidas a forragear precocemente devido a exposição a pesticidas, podem ter um desempenho ruim nessa tarefa (Chang et al., 2015), afetando toda a colônia, pois estas abelhas são as responsáveis pela coleta de água, néctar (carboidratos), pólen (proteína, lipídeos) ou própolis (material antimicrobiano) (Seeley, 1982) para a manutenção da colônia.

O corpo gorduroso não apresentou alterações morfológicas e ultraestruturais, como também ocorreu com as larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) expostas a diferentes inseticidas (Alves et al., 2010). Considerando que o corpo gorduroso é um importante local de detoxificação (Skowronek et al., 2021) e que foi utilizada concentração subletal (5 ppm), pode ser sugerido que o sistema de detoxificação foi capaz de impedir alterações morfológicas e ultraestruturais nesse órgão.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos, indicam que ciflumetofem gera danos no intestino médio e alterações na glândula hipofaríngea de operárias de *A. mellifera*, mesmo em uma concentração baixa, 5 ppm, podendo comprometer as funções desses órgãos e afetar a manutenção e saúde da colônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aki, T., Nara, A., Uemura, K. (2012). Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell biology and toxicology* 28, 125-131.
- Arthidoro de 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.
- 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, 834-843.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25–34.

- 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., Santos, C. G., de Resende, M. T. C. S., de Souza, D. L. L., dos Santos Souza, D., da Cruz Souza, A. M., Motta, J. V. O., Nere, P. H. A., Oliveira, A. H., 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.
- Catae, A. F., Roat, T. C., De Oliveira, R. A., Ferreira Nocelli, R. C., Malaspina, O. (2014). Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). *Microscopy Research and Technique* 77, 274e281.
- Chang, L. H., Barron, A. B., Cheng, K. (2015). Effects of the juvenile hormone analogue methoprene on rate of behavioural development, foraging performance and navigation in honey bees (*Apis mellifera*). *The Journal of Experimental Biology* 218, 1715-1724.
- Chen, X., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li., J., Li., Y, Li., M., Wang., Y., Zheng., Y. (2013). Chiral determination of a novel acaricide cyflumetofen enantiomers in cucumber, tomato, and apple by HPLC. *Journal of Separation Science* 36, 225-231.
- Crailsheim, K., Stolberg, E. (1989). Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 35 (8), 595e602.
- Deseyn, J., Billen, J. (2005). Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36, 49-57.
- Elaidy, W. K. M. (2014). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers with age. *Journal of Apicultural Research* 53, 377-384.

- Faita, M. R., de Medeiros Oliveira, E., Júnior, V. V. A., Orth, A. I., Nodari, R. O. (2018). Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere* 211, 566-572.
- Free J. B. (1961). Hypopharyngeal gland development and division of labour in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies, *Proceedings of the Royal Entomological Society of London B* 36, 5–8.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957.
- Grab, H., Branstetter, M. G., Amon, N., Urban-Mead, K. R., Park, M. G., Gibbs, J., Blitzer, E. J., Poveda, K., Loeb, G., Danforth, B. N. (2019). Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363, 282–284.
- Gradish, A. E., Van Der Steen, J., Scott-Dupree, C. D., Cabrera, A. R., Cutler, G. C., Goulson, D., Klein, O., Lehmann, D. M., Lückmann, J., O’Neill, B., Raine, N. E., Sharma, B., Thompson, H. (2019). Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology* 48, 12-21.
- Grant, K. J., DeVetter, L., Melathopoulos, A. (2021). Honey bee (*Apis mellifera*) colony strength and its effects on pollination and yield in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*). *PeerJ* 9, e11634.
- Gregorc, A. (2020). Monitoring of honey bee colony losses: A special issue. *Diversity* 12, 403.
- Grella, T. C., Soares-Lima, H. M., Malaspina, O., Nocelli, R. C. F. (2019). Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere* 236, 124255.
- Guimarães-Cestaro, L., Martins, M.F., Martínez, L.C., Alves, M. L. T. M. F., Guidugli-Lazzarini, K. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Serrão, J. E., Teixeira, É. W. (2020).

- Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *The Science of Nature* 107, 1-14.
- Hrassnigg, N., Crailsheim, K. (1998). The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 44, 393-404.
- Huang, Z. Y., Otis, G. W., Teal, P. E. A. (1989). Nature of brood signal activating the protein-synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae, Hymenoptera). *Apidologie* 20 (6), 455-464.
- Jaycox, E. R., Skowronek, W., Gwynn, G. (1974). Behavioral changes in a worker honey bee (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. *Annals of the Entomological Society of America* 67: 529–534.
- Jaycox, E. R. (1976). Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49: 165–170.
- 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, 303-313
- Li, X., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231-253.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Qin, D., Zheng, Y. (2012). Determination of cyflumetofen residue in water, soil, and fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35, 2743–2749.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Li, Y., Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and

- animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1300, 95-103.
- Lillie, R. D. (1965). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*; 3rd Ed. McGrawHill Book Co., New York.
- Lu, G., Wang, Y., Shi, Y., Zhang, Z., Huang, C., He, W., Wang, C., Shen, H. M. (2022). Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm* 3(3), e150.
- Meech, R., Miners, J. O., Lewis, B. C., Mackenzie, P. I. (2012). The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & therapeutics* 134, 200-218.
- Mercer, T. J., Gubas, A., Tooze, S. A. (2018). A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 293, 5386-5395.
- Moritz, B., Crailsheim, K. (1987). Physiology of protein digestion in the midgut of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 33, 923-931.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biology* 5, e168.
- Papa, G., Maier, R., Durazzo, A., Lucarini, M., Karabagias, I. K., Plutino, M., Bianchetto, E., Aromolo, R., Pignatti, G., Ambrogio, A., Pellecchia, M., Negri, I. (2022). The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. *Biology* 11, 233.
- Peters, L., Zhu-Salzman, K., Pankiw, T. (2010). Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology* 56, 132-137.

- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 345-353.
- Qin, K., Cheng, F., Pan, L., Wang, Z. (2022). Expression Profile of microRNAs during development of the hypopharyngeal gland in honey bee, *Apis mellifera*. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 12970.
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Version 4.0.2), Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at a high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Robinson, G. E. (1985). Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology* 31: 277-282.
- Robinson, G. E. (1987). Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 329-338.
- Rost-Roszkowska, M. M., Poprawa, I., Klag, J., Migula, P., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W. (2008). Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna* cf. *nylanderi* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. *Canadian Journal of Zoology* 86, 1179-1188.
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral ecology and sociobiology* 11, 287-293.
- 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.

- 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.
- Sgolastra, F., Hinarejos, S., Pitts-Singer, T. L., Boyle, N. K., Joseph, T., Lückmann, J., Raine, N.E., Singh, R., Williams, N.M., Bosch, J. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environmental Entomology* 48, 22-35.
- Solomon, R. W. (2009). Free and open source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology*, 192, 330-334.
- Stančić, Z., Fiket, Ž. (2023). Pollination patterns of flora and vegetation in northern Croatia with reference to *Apis mellifera*. *Acta Botanica Croatica* 82, 0-0.
- Stefanini, M., De Martino, Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174.
- Sun, D., Pang, J., Zhou, Z., Jiao, B. (2016). Enantioselective environmental behavior and cytotoxicity of chiral acaricide cyflumetofen. *Chemosphere* 161, 167-173.
- Takahashi, N., Nakagawa, H., Sasama, Y., Ikemi, N. (2012). Development of a new acaricide, cyflumetofen. *Journal of Pesticide Science* J12-03.
- Thompson, H. M., Wilkins, S., Battersby, A. H., Waite, R. J., Wilkinson, D. (2007). Modelling long-term effects of IGRs on honey bee colonies. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 63, 1081-1084.
- Urstadt, K. R. (2022). Staining intensity quantification protocol. https://docs.google.com/document/d/1BqgSem-WTosS1PKZo17T40u7fZFIPdIIr1Yuwg4EF_A/edit#heading=h.bxx1hlqvtvka.

- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R., Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One* 4, e6481.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.
- Wirawan, E., Berghe, T. V., Lippens, S., Agostinis, P., Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Research*, 22, 43-61.
- Zhang, W., Wan, X., Liu, Z., Xiao, L., Huang, H., Liu, X. (2017). The emerging role of oxidative stress in regulating autophagy: applications of cancer therapy. *Cellular and Molecular Biology* 63, 67-76.

CONCLUSÕES GERAIS

O ciflumetofem apresenta toxicidade para *A. mellifera*. As exposições das abelhas operárias adultas à CL₅₀ (concentração letal) e 5 ppm (concentração subletal) de ciflumetofem causaram alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio e glândula hipofaríngea. No intestino médio das abelhas expostas à CL₅₀ e 5 ppm de ciflumetofem observamos intensa vacuolização citoplasmática, fragmentação celular e liberação de vesículas da superfície apical das células digestivas. O índice de lesão no intestino médio foi significativo em 48h de exposição a CL₅₀ de ciflumetofem, contudo não foi significativo em 72h, assim como também ocorreu na exposição crônica à 5 ppm de ciflumetofem, que foi significativo em 72h de exposição e não significativo em 10 dias, indicando, portanto, uma possível recuperação do intestino médio, provavelmente devido aos processos de autofagia e de detoxificação. A presença de esferocristais nas células digestivas de abelhas operárias expostas a CL₅₀ de ciflumetofem, nos deixa claro que ciflumetofem é tóxico para as abelhas e, portanto, está sendo armazenado nos esferocristais, uma forma de tentar evitar que o pesticida cause danos ao organismo. Já no intestino médio das abelhas expostas a 5 ppm de ciflumetofem, observamos várias células sem organelas em seu interior, ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático que nos indicam degeneração celular. Nas glândulas hipofaríngeas, observamos maiores quantidades de secreção nas abelhas tratadas com ciflumetofem, em 24h, 48h, 72h de exposição à CL₅₀ e 72h de exposição à 5 ppm de ciflumetofem, indicando que ciflumetofem interfere na produção de secreção nessa glândula. Contudo, em 10 dias de exposição à 5 ppm de ciflumetofem, na análise ultraestrutural, as glândulas hipofaríngeas regrediram em relação às glândulas do controle, o que pode indicar um forrageio precoce. Já em relação ao corpo gorduroso, observamos apenas variações nas quantidades de proteínas em 24h e 72h de exposição à CL₅₀ de ciflumetofem, o que pode ter ocorrido devido ao sistema de detoxificação ter sido eficaz em impedir modificações nesse órgão. Concluimos, portanto, que

as alterações observadas podem afetar os processos digestivos e de absorção; a qualidade e quantidade de secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas, afetando assim toda a população, podendo comprometer a manutenção e saúde da colônia. Portanto, a classificação desse composto como sem efeitos ou com impacto limitado em artrópodes benéficos e inimigos naturais e com recomendação para uso no manejo integrado de pragas necessita ser reavaliado.