

**RAISSA SANTANA SERRA**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E CITOTÓXICAS NO INTESTINO MÉDIO  
DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) CAUSADAS POR ACARICIDA E  
FUNGICIDA**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadores: Luis Carlos Martínez

Jamile Fernanda da Silva Cossolin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

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

T

S487a                    Serra, Raissa Santana, 1990-  
2020                    Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio  
de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) causadas por Acaricida  
e Fungicida / Raissa Santana Serra. – Viçosa, MG, 2020.  
49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Polinizadores. 2. Pesticidas. 3. Toxicologia ambiental.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.799


**RAISSA SANTANA SERRA**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E CITOTÓXICAS NO INTESTINO MÉDIO  
DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) CAUSADAS POR ACARICIDA E  
FUNGICIDA**

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Raissa Santana Serra  
Autora



José Eduardo Serrão  
Orientador

Dedico a todos os pesquisadores e  
professores que hasteiam diariamente a  
bandeira do progresso, apesar do  
crescente descaso do país com a ciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, José Eduardo Serrão, por ser um exemplo de profissionalismo, integridade e altruísmo.

Agradeço às Agências de fomento CAPES e Fapemig por amparar as pesquisas necessárias ao nosso país. E ao CnpQ pela bolsa de estudos essencial para que o trabalho fosse realizado.

Agradeço à minha família por todo apoio emocional, confiança e amor, principalmente minha mãe Elizabeth Santana e avó Rita Santana. Agradeço ao meu namorado Vitor Bastos pela companhia nessa jornada.

Agradeço aos meus coorientadores Luis Martínez e Jamile Cossolin pelo suporte e conhecimento repassado.

Agradeço aos amigos e abelhudos que ajudaram diretamente neste projeto:, Matheus Tudor, Amanda Martins, Mayara Badaró e André Oliveira, Carolina Santos, Paulo Henrique, Lenise Carneiro. E também aos amigos que fazem parte da minha vida, alegrando os meus dias: Cristiane Marques, Lídia Dourado, Adriana Diniz, Ritanne Nery, Daniela Guedes, Francelina Rocha, Ana Paula, Carolina Viana

Agradeço à UFV e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade e pela eficiência, principalmente à secretária Eliane de Castro Silva. Agradeço ao Apiário pela manutenção das colmeias, assim como agradeço o professor Weyder Santana e os técnicos Gecelmino Correia (Lulu), Íris. Agradeço à equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise pelo suporte na pesquisa. Agradeço ao técnico Júlio Nunes do departamento de Solos pela consultoria de agrotóxicos.

A todos que auxiliaram este trabalho de alguma forma, meu muito obrigada.

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

“Canta, poeta, a liberdade, - canta.  
Que fora o mundo sem fanal tão grato...  
Anjo baixado da celeste altura,  
Que espanca as trevas deste mundo ingrato.  
Oh! sim, poeta, liberdade, e glória  
Toma por timbre, e viverás na história.”

Maria Firmina dos Reis.

## RESUMO

SERRA, Raissa Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) causadas por acaricida e fungicida.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Jamile Fernanda da Silva Cossolin e Luis Carlos Martinez.

Polinizadores, incluindo abelhas melíferas, são responsáveis pela reprodução de mais de 87% das espécies de plantas angiospermas, sendo vitais para a saúde dos ecossistemas e dos serviços agrícolas ao redor do mundo. A abelha *Apis mellifera* tem seu desaparecimento ligado a utilização de pesticidas, que além da mortalidade direta causam efeitos subletais, tais como alteração na função de órgãos. O epitélio do intestino médio é responsável pela digestão e absorção de nutrientes, além da detoxificação de substâncias ingeridas, como inseticidas. O objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças histológicas e citológicas do intestino médio de operárias de *A. mellifera* causadas pelo acaricida espiromesifeno e pelo fungicida azoxistrobina. O teste-limite foi conduzido de forma que se assegurasse  $DL_{50}$  acima de 100  $\mu\text{g}$ /abelha para cada pesticida. Confirmada a não toxicidade dos compostos, a dose recomendada para campo foi administrada per os, dissecando-se o intestino após 24h e 48h de exposição para análises. O intestino médio do grupo controle apresentou uma única camada de células digestivas, com núcleos esféricos, ninhos de células regenerativas e lúmen revestido de matriz peritrófica. As abelhas tratadas com ambos os pesticidas apresentaram mudanças histológicas, como desestruturação do epitélio, vacuolização e fragmentos celulares liberados para o lúmen, e mudanças citológicas, como aumento no número e alteração de mitocôndrias, alteração do labirinto basal e desestruturação do retículo endoplasmático rugoso. A ocorrência de danos ao intestino médio em *A. mellifera* é uma indicação de estes pesticidas devem ser investigados para garantir que sua utilização seja segura para as abelhas.

**Palavras-chave:** Abelhas. Azoxistrobina. Espiromesifeno. Toxicologia.

## ABSTRACT

SERRA, Raissa Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Histopathological and citotoxic changes in the midgut of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) made by acaricide and fungicide.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers Jamile Fernanda da Silva Cossolin and Luis Carlos Martinez.

Pollinators, including honey bees, are responsible for the successful reproduction of more than 87% of plant species, therefore, they are vital to ecosystem health and agricultural services world-wide. The decline of the honey bee, *Apis mellifera*, has been associated with high use of pesticides, which in addition to direct mortality have side effects, such as changes in the physiology and behavior. The midgut is responsible for the digestion, absorption of nutrients, and detoxification of xenobiotics, including insecticides. The aim of this study was to verify the histological and cytological changes in the midgut of *A. mellifera* workers caused by the fungicide azoxystrobin and the acaricide spiromesifen. The limit test had a  $LD_{50} > 100 \mu\text{g} / \text{bee}$  for both pesticides. After confirming the non-toxicity of the compounds, the field-recommended concentration was administered per os and the midgut was dissected after 24h and 48h of exposure. The midgut of the control group had a single layer of digestive cells, with spherical nuclei, nests of regenerative cells and a lumen lined with peritrophic matrix. Bees treated with both pesticides showed histological changes, such as epithelial disruption, vacuolization and cellular fragments released into the lumen, and cytological changes, such as increased number and alteration of mitochondria, alteration of the basal labyrinth and disruption of the rough endoplasmic reticulum. The mercury-bromophenol blue test showed high staining intensity in the nests of regenerative cells after 24 hours of exposure to azoxystrobin. The occurrence of damage to the midgut in *A. mellifera* is an indication that these pesticides should be investigated to ensure that their use is safety for bees.

**Keywords:** Azoxystrobin. Bee. Spiromesifen. Toxicology.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 1	15
<b>Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) causadas pelo espiromesifeno</b>	
CAPÍTULO 2	32
<b>Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) causadas pelo fungicida azoxistrobina</b>	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae) foi introduzida nas Américas pelos conquistadores espanhóis e portugueses em 1840 (BRAND, 1988), e se propagou pelo continente após a introdução da raça africana *A. m. scutellata* (KERR, 1967). Entretanto, nos últimos anos houve um decréscimo de quase 50% nas colmeias de abelhas melíferas no mundo. Simultaneamente, houve um aumento em mais de 300% na utilização de polinizadores nos campos de cultivo de frutas e vegetais (AIZEN; HARDER, 2009). As abelhas melíferas, sendo essenciais para a produção desses alimentos, são críticas na manutenção da saúde humana, o que impulsiona uma preocupação na saúde das colônias de abelhas e nas suas recentes perdas (SAMMATARO; YODER, 2012).

Colônias podem sucumbir por muitas razões, como escassez de alimento, doenças, parasitas e pesticidas (Sammataro & Yoder, 2012). Recentemente, a síndrome chamada Desordem do Colapso das Colônias (CCD), tem causado uma perda massiva de colônias, especialmente dentre as de uso comercial. Esse fenômeno ocorre desde 2006, com abelhas mortas fora da colmeia, invasão de parasitas e abandono de recursos (Cox-Foster et al., 2007). Uma hipótese da causa é a introdução de um agente infeccioso desconhecido, o que foi suportado pela evidência preliminar de que CCD pode ser transmitido na reutilização de equipamentos (Cox-Foster et al., 2007). Hipóteses mais recentes levam em consideração a interação de múltiplos fatores, como exposição a pesticidas, patógenos, parasitas e declínio de habitat com perda de diversidade floral e nutrição insuficiente (Neumann & Carreck, 2010; Smart et al., 2016).

As abelhas obtêm todas as necessidades nutricionais do néctar e do pólen, que são armazenados como mel e pão-de-abelha, respectivamente (DeGrandi-Hoffman et al., 2009). O néctar fornece carboidratos que fornecem energia para a manutenção, construção de favos e forrageio, enquanto o pólen fornece proteínas, vitaminas e minerais para desenvolvimento da cria. Colônias com reserva limitada de proteínas contém operárias que forrageiam precocemente (Schulz et al., 1998; Toth et al., 2005; Toth & Robinson, 2005), diminuindo sua longevidade (Rueppell et al., 2007). Adicionalmente, estresse nutricional afeta a resposta imune, possibilitando aumentos no nível de vírus nos indivíduos (DeGrandi-Hoffman et al., 2010).

A perda de colônias e a ocorrência de CCD têm sido associadas com parasitas, como o ácaro *Varroa destructor*. Colônias infestadas com esse ácaro são severamente enfraquecidas, principalmente pelo ataque às pupas em desenvolvimento. Indivíduos parasitados enquanto pupas têm menos peso ao emergir, subdesenvolvimento das glândulas hipofaríngeas (Schneider & Drescher, 1987) e outros problemas de malformação (Marcangeli et al., 1992), com longevidade encurtada (DeJong et al., 1982; Schneider & Drescher, 1987). *Varroa* spp. também é vetor de uma gama de vírus que acarretam deformidades que diminuem o vigor e afetam negativamente a habilidade de manutenção e forrageio (Koch & Ritter, 1991; Garedew et al., 2004; Kralj & Fuchs, 2006). Embora a presença de organismos patogênicos esteja ocorra de maneira consistente em colônias fadadas ao perecimento, colônias fortes podem responder a patógenos e parasitas e extinguir seus efeitos antes da manifestação de infecções sérias, pois as abelhas têm defesas mecânicas, imunológicas e fisiológicas contra esses patógenos (Evans et al., 2006; Schmid et al., 2008; Evans & Spivak, 2010).

Em adição às doenças, a saúde das colônias pode ser comprometida por toxinas presentes no ambiente. A contaminação de cera e estoque de alimento por pesticidas é comum, principalmente em colônias comerciais usadas para polinização (Mullin et al., 2010). Resíduos de diferentes pesticidas ocorrem no ninho, especialmente acaricidas como fluvalinato, coumafós e amitraz, e fungicidas, como clorotalonil, tebuconazole e ciprodinil (Pareja et al., 2011; Kiljanek, et al., 2016; Berg et al., 2018), sendo que o acúmulo de fungicida no pólen é frequentemente mais elevado que outras categorias de pesticidas (Pettis et al., 2013). Essas toxinas podem causar reduções agudas e crônicas na saúde das abelhas, inclusive em interações com patógenos, como *Nosema* spp. (Alaux et al., 2010).

A maioria dos pesticidas não sistêmicos afeta o sistema nervoso dos insetos, mas podem induzir vários níveis de citotoxicidade nos órgãos relacionados a absorção, metabolismo e excreção, e são capazes de causar efeitos além daqueles previstos pelo seu modo de ação (Sammataro & Yoder). Entre os órgãos não-alvos dos pesticidas, o intestino médio e os túbulos de Malpighi são os mais expostos (Malaspina & Silva-Zacarin, 2006), pois estão envolvidos na absorção e excreção de xenobióticos, respectivamente, e a investigação de sua morfologia pode mostrar efeitos colaterais induzidas por contaminantes ambientais (Cruz et al., 2010).

O intestino médio, onde ocorre a maior parte da digestão e absorção de nutrientes (Chapman, 1998) é um órgão de grande importância para o estudo da patologia e toxicologia dos insetos. Adicionalmente, sua morfologia é bem descrita na literatura (Snodgrass, 1956;

Jimenez & Gilliam, 1990; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999), possibilitando a interpretação dos resultados.

Tendo em vista os fatores acima que levam a redução da longevidade das abelhas e a necessidade de proteger as populações desses importantes polinizadores, deve-se investigar maneiras de prevenir a exposição a substâncias prejudiciais, para que pesticidas, quando necessários, sejam utilizados de maneira segura para abelhas. Os capítulos seguintes analisam os efeitos colaterais no intestino médio da abelha *A. mellifera* de um acaricida e um fungicida considerados não-tóxicos para esses insetos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizen, M.A., Harder, L.D., 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology* 19: 915–918.
- Alaux, C., Brunet, fr J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 12(3), 774–782.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., LeConte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6(4), 562–565.
- Berg, C., Hill, M., Bonetti, C., Mitchell, G. C., Sharma, B., 2018. The effects of iprodione fungicide on survival, behavior, and brood development of honeybees (*Apis mellifera* L.) after one foliar application during flowering on mustard. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(12), 3086–3094.
- Brand, D. D., 2017. The honey bee in New Spain and Mexico. *Journal of Cultura Geography* 157(5), 469.
- Cavalcante, V. M., C. Cruz-Landim. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: A review. *Naturalia* 24: 19–40.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects: Structure and Function* (4th ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Lipkin, W. I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848), 283–287.
- Cruz, A. D. S., Silva-Zacarin, E. C. M. da, Bueno, O. C., & Malaspina, O., 2010. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biology and Toxicology*, 26(2), 165–176.
- De Jong, D., De Jong, D., De Jong, P. H., Gonçalves, L. S., 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 21(3), 165–167.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., Huang, M. H., 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 56(9), 1184–1191.
- Degrandi-Hoffman, G., Vreeland, R., Sammataro, D., & Alarcon, R., 2009. The importance of microbes in nutrition and health of honey bee colonies: Where do we go from here? *American Bee Journal* 149(8), 755–757.
- Evans, J. D., 2006. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Handbook of Environmental Chemistry* 5(93): 135–139.
- Evans, J. D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S62–S72.
- Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I., 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35, 67–76.

- Jimenez, D. R., & Gilliam, M., 1990. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell and Tissue Research*, 261(3), 431–443.
- Kerr, W. E. 1967. The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal* 39 (2), 3–5.
- 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 (2), 5–24.
- Koch, W., W. Ritter., 1991. Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Zentralbl Veterinaermed* 38: 337–344.
- Kralj, J., Fuchs, S., 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie* 37: 577–587.
- Malaspina, O., Silva-Zacarin, E. C. M. da., 2006. Cell Markers for Ecotoxicological Studies in Target Organs of Bees. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 23, 3–4.
- Marcangeli, J., Monetti, L., Fernandez, N., 1992. Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie*,23(5), 399–402.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J. S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* 5(3).
- Neumann, P., Carreck, N. L., 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49(1), 1–6.
- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Heinzen, H., 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(10), 3844–3858.
- Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrik, M. K., Page Jr, R. E., 2007. Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Experimental Gerontology* 42(10), 1020–1032.
- Sammataro, D., & Yoder, J. A. (Eds.), 2012. *Honey Bee Colony Health*. New York: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11318>
- Sammataro, D., Yoder, J. A. (Eds.), 2012. *Honey Bee Colony Health*. New York: CRC Press.
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., Stanley, D. W., Tautz, J., 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* 54(2), 439–444.
- Schneider, P., Drescher, W., 1987. The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight; development on weight and hypopharyngeal glands; and longevity of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 18: 101–110.
- Schulz, D. J., Huang, Z. Y., Robinson, G. E., 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42(5), 295–303.

- Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z., Spivak, M., 2016. Linking measures of colony and individual honey bee health to survival among apiaries exposed to varying agricultural land use. *PLoS ONE* 11(3), 10–13.
- Snodgrass, R. E. ,1956. *Anatomy and Physiology of the Honeybees*. Comstock Publishing, New York, NY, U.S.
- Toth, A. L., Robinson, G. E., 2005. Worker nutrition and division of labour in honey bees. *Animal Behavior* 69: 427–435.
- Toth, A. L., Kantarovich, S., Meisel, A. F., & Robinson, G. E., 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology* 208(24), 4641–4649.

## CAPÍTULO 1

### **Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio de *Apis mellifera***

#### **(Hymenoptera: Apidae) causadas pelo espiromesifeno**

### **1. INTRODUÇÃO**

As abelhas melíferas *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), são insetos eussociais conhecidos pela produção de mel e outras substâncias com propriedades alimentícias e terapêuticas (Cornara et al., 2017). Mais relevante que os produtos acima, essa abelha é uma das principais polinizadoras de várias espécies de plantas, com função em ecossistemas terrestres, pois proporcionam um serviço vital para a diversidade e manutenção das comunidades de plantas silvestres e (Ashman et al., 2004; Aguilar et al., 2006, Potts et al., 2010) e cultivadas (McGregor, 1976; Klein et al.; 2007, Ricketts et al., 2008). *Apis mellifera* é importante para a agricultura por ter colmeias de fácil manutenção e transporte, beneficiando cerca de 39 culturas agrícolas (Klein et al., 2007).

Apesar do aumento de mais de 300% em cultivos dependentes de polinizadores, houve um declínio global de abelhas melíferas no último século (Aizen & Harder, 2009). Fatores como privação de alimento, doenças e parasitas podem enfraquecer colônias, e, apesar de não serem os alvos dos agroquímicos utilizados no combate às pragas agrícolas, as abelhas são afetadas por uma variedade de pesticidas ao entrar em contato com o pólen, néctar, resina e água coletados durante o forrageio (Devillers, 2002). Alguns desses compostos químicos apresentam interações com doenças e parasitas de abelhas (Nazzi et al., 2012).

Os fatores mencionados acima podem estar relacionados com a Desordem do Colapso das Colônias (CCD) (Freitas & Pinheiro, 2010), que tem sido relatada desde 2006 e descreve o desaparecimento de grande número de abelhas sem uma razão específica (van Engelsdorp et al., 2009) em áreas de práticas agrícolas intensivas (Pareja et al., 2011). O abandono de caixas com mel, pólen, cria, rainha e em alguns casos, operárias jovens; são sintomas de CCD (Stokstad, 2007; Pires, 2009). Abelhas mortas não são encontradas dentro ou próximas das colmeias, o que dificulta os estudos em relação a esse fenômeno (Pareja et al., 2011). A hipótese mais aceita é de que o CCD é uma síndrome de stress causado por vários fatores que agem individualmente e/ou combinados (van Engelsdorp et al., 2009).

No Brasil ainda não há dados oficiais relativos à perda de colônias, apesar da preocupação com problemas semelhantes aos descritos para o CCD e relatos recentes de mortes de milhões de abelhas (Pires et al., 2016; Rosa et al., 2019). Nesse contexto, os agrotóxicos são relacionados a CCD por causar mortalidade em abelhas e, em doses subletais, afetam o comportamento de orientação (Belzunces et al., 2012; Henry et al., 2012; Palmer et al., 2013; Peng & Yang, 2016). Além disso, imunossupressão deixam as abelhas mais suscetíveis às doenças e são atribuídas à ação de pesticidas (Wu et al., 2011; Halm et al., 2006; Pettis et al., 2012;; De Grandi-Hoffman et al., 2013; Di Prisco et al., 2013). Efeitos subletais causados por pesticidas que afetam órgãos dos insetos têm sido pouco estudados, apesar do conhecimento sobre alterações fisiológicas (Desneux et al., 2007; Belzunces et al., 2012; Peng & Yang, 2016).

Em abelhas melíferas, a ingestão de néctar e pólen contaminados é a forma mais comum de exposição a pesticidas. O intestino médio é o local de digestão e absorção de nutrientes (Cruz-Landim, 2009) e responsável pela detoxificação de substâncias xenobióticas ingeridas (Mao et al., 2011). O intestino médio dos insetos pode apresentar alterações histológicas induzidas por contaminantes absorvidos em conjunto com o alimento, como deltametrina, fipronil, malation, tiametoxam, espinosade, imidacloprida, iprodione, piriproxifen, tebufenozide, espinosade e esquamocina (Kakamand et al., 2008; Gregorc & Ellis, 2011; Fiaz et al., 2018a, 2018b; Martínez et al., 2018; Carneiro et al., 2019; Fiaz et al., 2019; Martínez et al., 2019; Santos-Junior et al., 2020).

Dentre os pesticidas, o espiromesifeno é um acaricida/inseticida de contato, não-sistêmico e específico para o controle de ácaros e moscas brancas. Esse inseticida é utilizado em estufas de plantas ornamentais e lavouras de diversas culturas, como algodão, berinjela, café, cítricos, goiaba, melão, milho, pimentão, soja e tomate (Bretschneider, 2003; Nauen, 2003). O espiromesifeno pertence a nova classe de inseticidas cetoenóis, derivados do ácido tetrâmico e age bloqueando a biossíntese de lipídios ao inibir a Acetil-CoA carboxilase (Bretschneider, 2003). Devido a sua baixa toxicidade aguda contra abelhas (EFSA, 2012), o espiromesifeno é patentado para controle do ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Parasitiformes: Varroidae) que parasita *A. mellifera*, sob a forma de spray seco sobre as colônias no tratamento da varroatose (Fougeroux, 2012; Simone-Finstrom, 2016), um dos fatores associados ao CCDs (Rosenkranz et al., 2010; Goulson et al., 2015). Apesar disso, não há estudos que comprovem a eficácia do espiromesifeno contra a varroatose ou testem as consequências subletais nas abelhas expostas ao pesticida.

Considerando a larga utilização do espiromesifeno e detecções de resíduos no pólen presente em colônias de *A. mellifera* (Choudhary & Sharma, 2008; Kiljanek et al., 2016), é necessário testar os efeitos desse composto químico em órgãos não-alvos, como o intestino médio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças histológicas e citológicas do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera* causadas pelo espiromesifeno via ingestão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Abelhas**

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* foram obtidas de quadros de cria de colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 32 °C e 60-80% de umidade relativa, e alimentadas com mel e pólen fermentado, ad libitum, por três dias anteriores aos experimentos.

### **2.2. Teste-limite**

O espiromesifeno (Oberon® SC 240 g L<sup>-1</sup>, Uberaba, MG, Brasil) foi utilizado para os estudos histopatológicos no intestino médio de *A. mellifera*. Considerando sua baixa toxicidade (EFSA, 2012), foi realizado o teste-limite, conforme protocolo da 'Organisation for Economic Co-operation and Development' (OECD, 1998; Fischer & Moriarty, 2014) para constatação de que a dose letal é maior que 100 µg/abelha. Essa dose foi administrada para grupos de 10 abelhas de três dias de idade, em solução de sacarose a 50% (m/v) ad libitum, enquanto o grupo controle foi alimentado apenas com a solução de sacarose. Os testes foram realizados em triplicata e a mortalidade de cada grupo foi avaliada após 4 h, 12 h, 24 h e 48 h. Constatada a não mortalidade durante o teste-limite, e no intuito de se obter um cenário realista de exposição em campo, foi escolhida a dose comercial máxima de 600 mL p. c./ha (Oberon®, 240 g i.a./L) indicada pelo fabricante do produto para o combate de pragas. O cálculo da exposição para abelhas foi determinado convertendo a dose máxima de aplicação para uma taxa de produto/cm<sup>2</sup> (Davis & Williams, 1990), resultando em uma dose de 1.44 µg i. a./abelha.

### **2.3. Exposição**

Uma solução estoque da concentração calculada foi preparada em sacarose a 50% e alíquotas foram colocadas em microtubos de plástico, estimando-se o consumo de 33

$\mu\text{L}/\text{abelha}/\text{dia}$  (Decourtye et al., 2003; 2005), e uma exposição de  $1.44 \mu\text{g i.a.}/\text{abelha}$  de espiromesifeno. O primeiro e segundo grupos receberam espiromesifeno por 24 h e 48 h respectivamente, enquanto o terceiro e quarto grupos receberam apenas solução de sacarose por 24 h e 48 h. Para cada grupo, foram alimentadas 60 abelhas divididas em seis potes de plástico de 250 mL, contabilizando 10 abelhas por pote (Medrzycki et al., 2013).

### **2.3. Histologia**

Vinte operárias tratadas com espiromesifeno e 20 do grupo controle, após 24 h e 48 h de exposição, foram anestesiadas a  $-4^{\circ}\text{C}$ , o intestino médio dissecado em solução salina para insetos ( $0,1 \text{ M NaCl} + 0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4 + 0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ ) e transferido para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h a  $5^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram desidratadas em gradiente de etanol ( $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $90^{\circ}$  e  $95^{\circ}$ ) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções com  $2,5 \mu\text{m}$  de espessura foram obtidas em micrótomo, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

### **2.4. Ultraestrutura**

Dez abelhas tratadas com espiromesifeno e 10 do grupo controle, após 24 h e 48 h de exposição, foram dissecadas e os intestinos médios separados e transferidos para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio  $0,2 \text{ M}$ , pH 7,2, contendo  $0,2 \text{ M}$  de sacarose por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio por 2 h, e lavadas no mesmo tampão, seguindo desidratação em série crescente de etanol ( $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $90^{\circ}$  e  $99^{\circ}$ ). As amostras foram embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.) e as seções ultrafinas ( $80\text{-}90 \text{ nm}$  de espessura), obtidas com navalha de vidro em ultramicrótomo PowerTomes PT-X (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA), foram 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).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Teste-limite**

O teste-limite não apresentou mortalidade para as abelhas nos grupos controle e tratamento, indicando que a  $DL_{50}$  do espiromesifeno é maior que 100  $\mu\text{g}/\text{i.a.}/\text{abelha}$ .

### **3.2. Histopatologia**

O epitélio do intestino médio das operárias de *A. mellifera* do grupo controle consistiu de uma camada única de células digestivas prismáticas (Fig. 1A) com núcleos esféricos (Fig. 1B). A porção basal do epitélio mostrou ninhos de células regenerativas (Fig. 1B) e o lúmen foi delimitado pela matriz peritrófica, produzida pelas células digestivas (Fig. 1B). As fibras musculares foram distribuídas em camadas circulares e longitudinais (Figs. 1A e 1B). Não houve diferença entre os períodos de 24 h e 48 h.

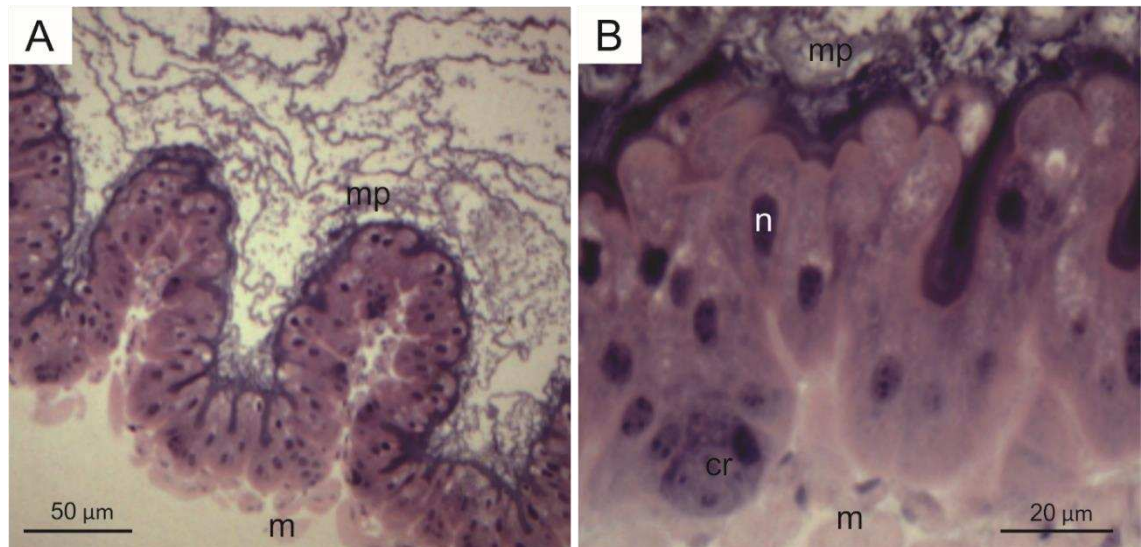


Figura 1. Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera* do grupo controle. A: visão geral do epitélio revestido externamente por uma camada muscular (m) e matriz peritrófica (mp) que limita o lúmen. B: epitélio contendo ninhos células regenerativas na base (cr), células digestivas colunares (cd) com núcleos (n) bem desenvolvidos.

Após 24 h da exposição ao espiromesifeno, o intestino médio das operárias de *A. mellifera* apresentou desestruturação do epitélio, com alta vacuolização citoplasmática (Fig. 2A), produção intensificada de matriz peritrófica (Fig. 2B) e aumento nas protrusões contendo o núcleo para o lúmen (Fig. 2C). Após 48 h da exposição, as protrusões celulares foram desprendidas e liberadas em fragmentos celulares no lúmen, algumas contendo o núcleo celular (Fig. 2D). Algumas células apresentaram intensa condensação da cromatina nuclear, evidenciando a ocorrência de picnose (Fig. 2F).

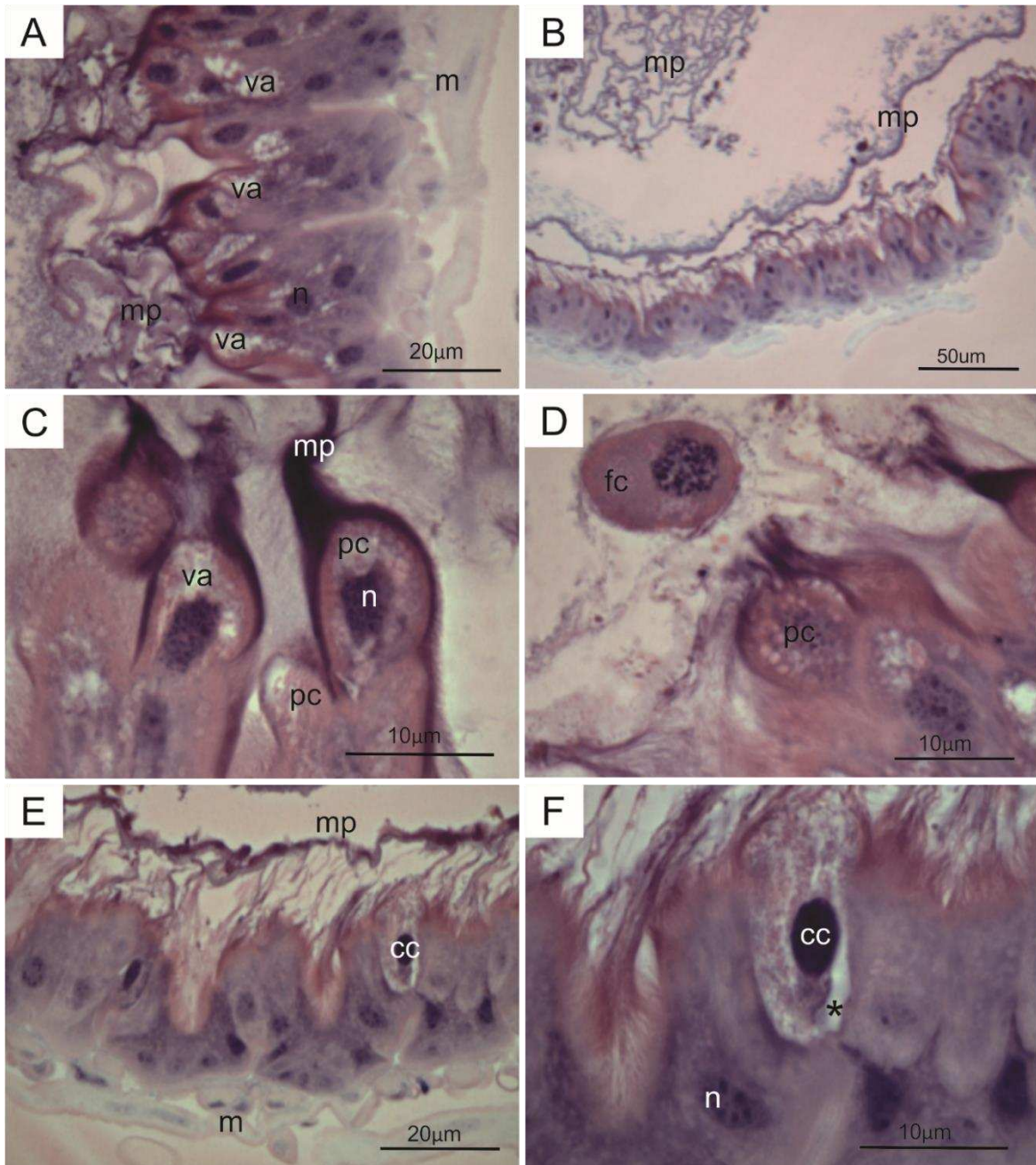


Figura 2: ABC: Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera* 24 h após exposição ao espiromesifeno. A: epitélio apresentando intensa desestruturação e vacúolos (va). B: visão geral do epitélio apresentando desestruturação e várias camadas de matriz peritrófica (mp). C: células epiteliais irregulares com protrusões citoplasmáticas (pc) e vacúolos (va). DEF: epitélio exposto ao espiromesifeno por 48 h. D: epitélio irregular com protrusão citoplasmática (pc) e fragmento celular liberado no lúmen (fc). E: epitélio irregular com produção de matriz peritrófica (mp) e célula apresentando núcleo com cromatina condensada (cc). F: detalhe da figura anterior mostrando o citoplasma degenerado (\*), um núcleo normal (n) e núcleo com cromatina condensada (cc).

### 3.2. Citotoxicidade

As células digestivas do intestino médio das abelhas do grupo controle mostraram a região apical com microvilosidades bem desenvolvidas e citoplasma rico em mitocôndrias, com algumas vesículas elétron-transparentes (Fig. 3A). A região perinuclear foi rica em retículo endoplasmático rugoso organizado em cisternas achatadas e o núcleo teve predomínio de cromatina descondensada com nucléolo bem desenvolvido (Fig. 3B). A região basal apresentou invaginações da membrana plasmática formando canais dilatados no labirinto basal com algumas figuras mielínicas e vesículas elétron-transparentes (Fig. 3C),

Após 24h da exposição ao espiromesifeno, ocorreram mudanças no citoplasma das células digestivas, que apresentaram sinais de degeneração com protrusões apicais dilatadas com regiões elétron-transparentes sem organelas e acúmulo de mitocôndrias no citoplasma subjacente (Fig. 4A). Na região basal da célula houve estreitamento dos canais do labirinto basal, presença de alguns vacúolos e início de fragmentação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 4B). Após 48 h, houve aumento na quantidade de vacúolos (Fig. 5A), degeneração citoplasmática com muitas áreas elétron-transparentes sem organelas e desestruturação do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 5B).

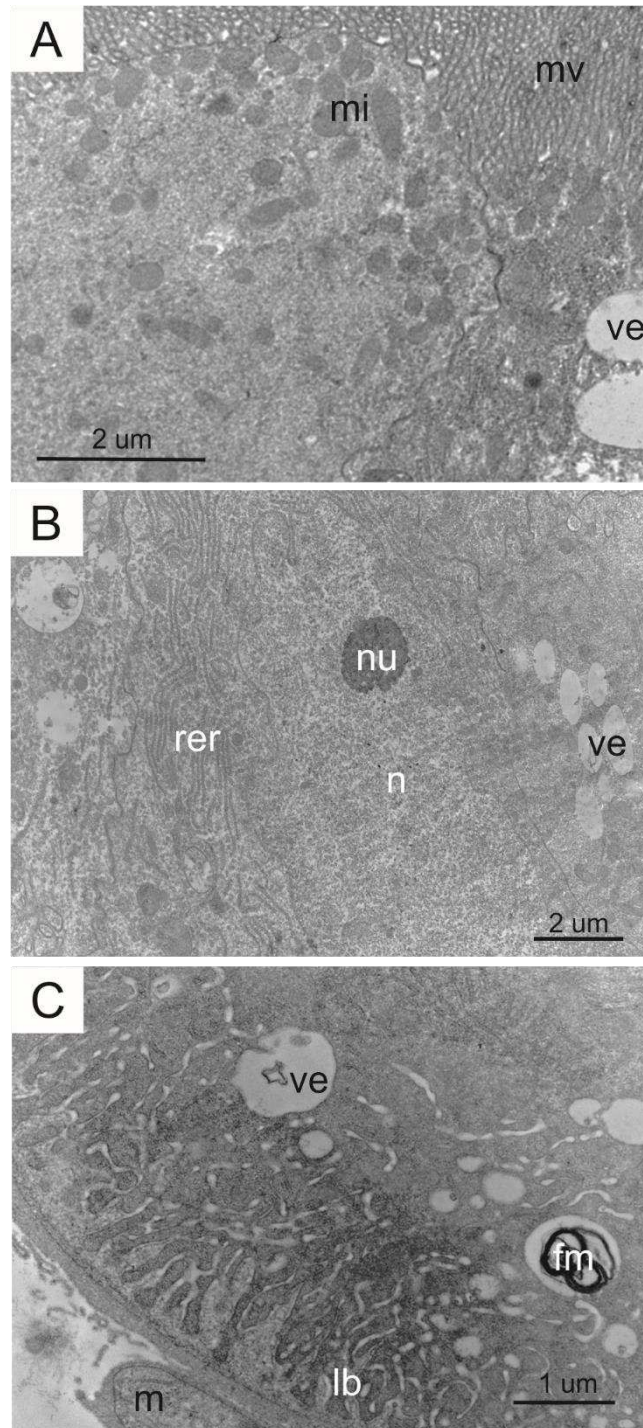


Figura 3. Eletromicrografia das células digestivas do intestino médio de *Apis mellifera*. A: porção apical das células digestivas contendo microvilosidades (mv), numerosas mitocôndrias (mi) e algumas vesículas de secreção elétron-transparentes (ve). B: porção mediana com núcleo (n) e nucléolo (nu) e citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (rer). C: porção basal com labirinto basal (lb) com canais largos, figura mielínica (fm), e algumas vesículas (ve). mb – membrana basal. m - músculo.

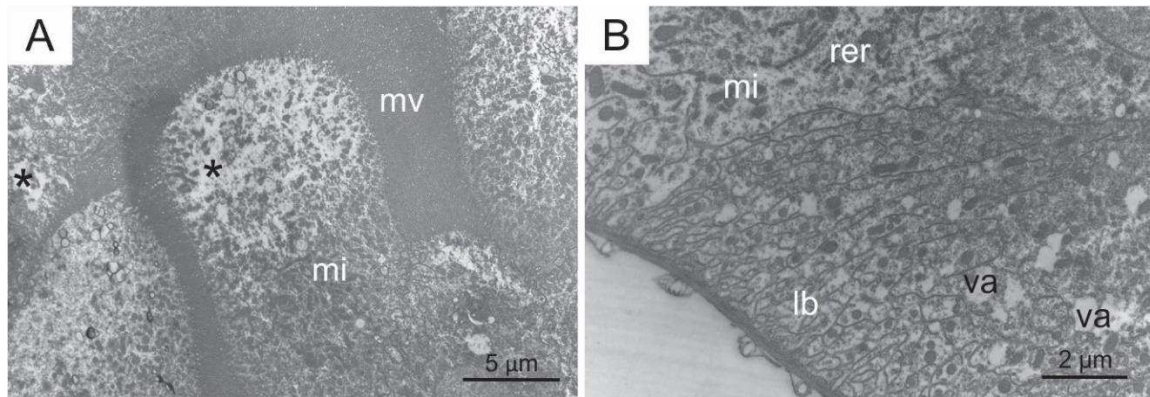


Figura 4. Eletromicrografia das células digestivas de *Apis mellifera* após 24 h de exposição ao espiromesifeno. A: porção apical da célula mostrando intensa degeneração citoplasmática (\*) e acúmulo de mitocôndrias (mi). B. porção basal da célula com labirinto basal (lb) com canais estreitos e retículo endoplasmático rugoso com início de desorganização (rer) e formação de vacúolos (va). mv – microvilosidades.

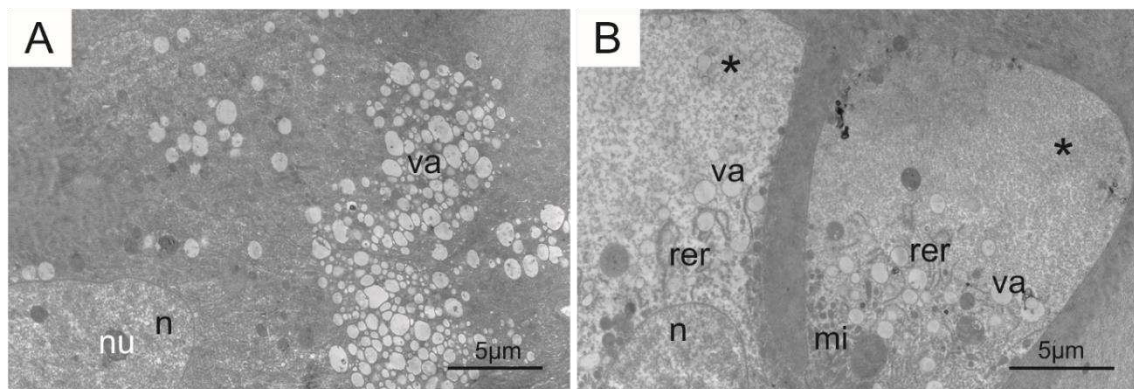


Figura 5. Eletromicrografia das células digestivas de *Apis mellifera* após 48 h de exposição ao espiromesifeno. A: porção mediano apical mostrando aumento na quantidade de vacúolos (va), núcleo (n) e nucléolo (nu). B. porção apical apresentando intensa degeneração citoplasmática sem a presença de organelas (\*), retículo endoplasmático rugoso desordenado (rer), acúmulo de vacúolos (va) e mitocôndrias (mi).

#### 4. DISCUSSÃO

A exposição ao espiromesifeno causa alterações histológicas e citológicas no intestino médio da abelha *A. mellifera*, embora não tenha efeitos letais nas mesmas como confirmado no teste-limite com a  $DL_{50}$  maior que 100  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ . A falta de toxicidade para a abelha está de acordo com os relatórios das agências reguladoras de pesticidas (EFSA, 2012; PMRA, 2011;

Zhu et al., 2015), que classificam o espiromesifeno como “praticamente não-tóxico” (WSDA, 2010). O espiromesifeno é considerado seguro para artrópodes não-alvos (Varghese & Mathew, 2013; Choudhary et al., 2009), porém não há dados sobre a tolerância de insetos benéficos a longo prazo. Autoridades europeias consideram como irrelevante a influência desse pesticida sobre as abelhas, pois é recomendada a sua aplicação somente em áreas de cultivo protegido (EFSA, 2012), tecnologia rara no Brasil (Darezzo et al., 2004), o que reafirma a importância do conhecimento sobre a segurança do uso desse pesticida. Pelo seu uso considerado seguro para abelhas, e pela sua toxicidade para ácaros, incluindo os do gênero *Varroa*, o espiromesifeno é um ingrediente patentado para tratamentos químicos no controle da varroatose nas colônias (Fougeroux, 2012; Simone-Finstrom, 2016), no entanto sua eficácia carece de estudos. A Agência Regulatória de Manejo de Pestes do Canadá (Health Canada Pest Management Regulatory Agency) não reportou mortalidade e diferenças comportamentais em fêmeas adultas de *A. mellifera*, mas encontrou mortalidade em machos, número reduzido de ovos e larvas no favo de cria e diminuição do peso das colônias, após a alimentação dessas com alimento contaminado por espiromesifeno (PMRA, 2011). A mortalidade somente de machos também foi observada para *Bombus terrestris* (EFSA, 2012).

A exposição per os à dose de campo de espiromesifeno causa mudanças histológicas no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* após 24 h e 48 h de tratamento. Após 24 h de tratamento ocorrem características de degeneração celular como epitélio irregular, vacuolização citoplasmática e protruções citoplasmáticas. A degeneração celular no intestino médio de insetos tem sido reportada em resposta à exposição aos inseticidas tebufenozide (Fiaz et al., 2018b), permetrina (Martínez et al., 2018) e espinosade (Santos-Junior et al., 2020). Vacúolos, apesar de comuns nas células digestivas do intestino médio, podem acontecer em maior número em células em autofagia durante a renovação de organelas, reciclagem e reorganização citoplasmática (Alberts et al., 2014). A autofagia é um processo importante para a homeostase, descarte de organelas degradadas, reciclagem de proteínas e eliminação de patógenos, podendo ser ativadas por estresses e doenças (Levine & Kroemer, 2008) ou mediadas por compostos xenobióticos como a esquamocina (Fiaz et al., 2018a), tebufenozide (Fiaz et al., 2018b) e iprodione (Carneiro et al. 2019).

Após 48h de tratamento, as protruções citoplasmáticas se destacam do epitélio em fragmentos celulares liberados no lúmen, muitas vezes contendo núcleo com cromatina condensada. As protruções, semelhantes a secreções apócrinas (Caetano et al., 1994), contém

enzimas e podem estar relacionadas a desintoxicação de substâncias prejudiciais (Martínez et al., 2018; Santos-Junior et al., 2019). Neste estudo ocorreu a formação de núcleos picnóticos e a liberação de fragmentos celulares contendo núcleos no lúmen, sugerindo que os danos causados pelo espiromesifeno são severos e comprometem o aparato celular e os processos de digestão e absorção de nutrientes de *A. mellifera*.

A análise em microscopia eletrônica de transmissão mostra que os danos nas células digestivas de *A. mellifera* causados pelo espiromesifeno são a desorganização citoplasmática, desestruturação do retículo endoplasmático rugoso aumento na quantidade de mitocôndrias e estreitamento dos canais do labirinto basal após 24 h e agravados após 48 h de exposição ao pesticida. Essas mudanças citológicas indicam que os danos causados pelo espiromesifeno estão relacionados com a produção de energia e de proteínas como reportado para abelhas expostas a doses subletais de tiametoxame (Catae et al., 2014). No entanto, o estreitamento dos canais do labirinto basal é uma resposta contrária àquela das células digestivas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) expostas a tebufenozide e esquamocina onde o alargamento dos canais do labirinto basal está associado ao desbalanço da homeostase celular (Fiaz et al., 2018a, 2018b).

Danos nas células digestivas do intestino médio causados por inseticidas comprometem a sobrevivência celular, homeostase e imunidade inata dos insetos (Johnson et al., 2009; Mao et al., 2011; Han et al., 2012, Higes et al., 2013), portanto a não-letalidade do espiromesifeno em *A. mellifera* não garante a segurança deste composto sob a perspectiva de conservação das abelhas.

Os resultados deste estudo mostram que o espiromesifeno não causa efeito letal quando ingerida pela abelha *A. mellifera*. Entretanto, mudanças histológicas e citológicas ocorrem no intestino médio, o que pode afetar o fitness desse inseto. Como o espiromesifeno é usado em lavouras visitadas por abelhas e no controle da varroatose, este estudo contribui para o conhecimento dos danos causados por esse composto nas células digestivas do intestino médio de *A. mellifera* e conseqüentemente, estudos futuros devem ser realizados para garantir a utilização desse pesticida reduzindo os riscos ecotoxicológicos nas populações de abelhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., Aizen, M.A., 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: 968–980.
- Aizen, M.A., Harder, L.D., 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology* 19: 915–918.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., et al, 2014. *Molecular Biology of the Cell*, 6 ed. Garland Science, New York.
- Ashman, T.L, Knight, T.M., Steets, J. A., Amarasekare, P., Burd, M. et al., 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85(9): 2408–2421.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J.L., 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348–370.
- Bretschneider, T., Benet-Buchholz, J., Fischer, R., Nauen, R., 2003. Spirodiclofen and spiromesifen - Novel acaricidal and insecticidal tetrionic acid derivatives with a new mode of action. *Chimia*. 57, 697–701.
- Caetano, F.H., Torres Jr., A.H., Camargo-Mathias, M.I., Tomotake, M.E.M., 1994. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios* 80: 235-242.
- Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E., 2019. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, 109991.
- 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, 274–281.
- Choudhary, A., Sharma, D.C. and Badiyala, A. 2009. Relative safety of some pesticides against honey bees, *Apis cerana cerana* Fab and *Apis mellifera* L on mustard (*Brassica juncea* L. Czern). *Pesticide Research Journal* 21(1), 67–70.
- Choudhary, A., Sharma, D.C., 2008. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). *Environmental Monitoring and Assessment* 144, 143–150.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B., 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology* 8: 1-20.
- Cruz-Landim, C., 2009. *Morfologia e função de sistemas*. Editora Unesp, São Paulo.
- Darezzo, R.J.; Aguiar, R.L.; Aguilera, G.A.H.; Rozane, D.E.; Silva, D.J.H., 2004. *Cultivo em ambiente protegido: histórico, tecnologias e perspectivas*. Viçosa, UFV, 331P.

- Davis, B.N.K., Williams, C.T., 1990. Buffer zone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. *Environmental Pollution* 63, 247–259.
- De Grandi-Hoffman, G., Chen, Y., Simonds, R., 2013. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 4, 71–89.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., et al., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 242–250.
- Decourtye, A., Lacassie, E., Pham-Delégue, M.H., 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science* 59, 269–278.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81–106.
- Devillers, J., Pham-Delègue, M.-H., 2002. *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Taylor & Francis, Londres.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., et al., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 18466–18471.
- EFSA, 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spiromesifen. *EFSA Journal* 10(10), 2859.
- Fiaz, M., Martínez, L.C., Costa, M. da S., Cossolin, J.F.S., Plata-Rueda, A., et al., 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., Shareef, M., et al., 2018. Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Chemosphere* 212, 337–345.
- Fischer, D., Moriarty, T., 2014. *Pesticide risk assessment for pollinators*. Wiley-Blackwell, Florida, USA.
- Fougeroux, A., 2012. Use of spirodiclofen and or spiromesifen for control or protection against bee mites, reduction of infestations of bee mites on bees or in or around their hives, protection of bees from attack by mites, or treatment of varroaosis. US 2013/0338222.
- Freitas, B.M., Pinheiro, J.N., 2010. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis* 14(1), 266–281.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347(6229).

- Gregorc, A., Ellis, J.D., 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 200–207.
- Halm, M.P., Rortais, A., Arnold, G., Taséi, N., Rault, S., 2006. New Risk Assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science & Technology* 40, 2448–2454.
- Han, P., Niu, C.Y., Biondi, A., Desneux, N., 2012. Does transgenic Cry1Ac + CpTI cotton pollen affect hypopharyngeal gland development and midgut proteolytic enzyme activity in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology* 21, 2214–2221.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29.
- Johnson, R.M., Evans, J.D., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R., 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14790–14795.
- 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.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Gawel, M., et al., 2016. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A* 1435, 100–114.
- 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.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27–42.
- Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 12657–12662.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Neves, G. da S., 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*. USDA Agriculture Handbook No. 496. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

- Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L.P., Chauzat, M., et al., 2013. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52, 1–60.
- Nauen, R., Bretschneider, T., Elbert, A., Fischer, R., Tiemann, R., 2003. Spirodiclofen and Spiromesifen. *Pesticide Outlook* 14, 243–245.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., et al., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens* 8(6), 1-16.
- OECD, 1998. Guideline 213, honeybees, acute oral toxicity test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. {[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test\\_9789264070165-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test_9789264070165-en)} Acessado em Novembro 2019.
- Palmer, M.J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G.A., et al., 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications* 4, 1634–1638.
- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 3844–3858.
- Peng, Y.C., Yang, E.C., 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific Reports*. 6, 1–13.
- Pettis, J.S., van Engelsdorp, D., Johnson, J., Dively G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99 153–158.
- Pires, C.S.S., de Mello Pereira, F., do Rêgo Lopes, M.T., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, É.W., 2016. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: Há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51, 422–442.
- PMRA, 2011. Spiromesifen - Proposed registration decision. Health Canada Pest Management Regulatory Agency {<http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-POPRC12FU-SUBM-Dicofol-Canada-06-20161209.En.pdf> } Acessado em Novembro 2019.
- 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 and Evolution* 25: 345–353.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Ricketts, T.H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., et al., 2008. Landscape effects of on crop pollination services, are there general patterns? *Ecology Letters* 11, 499-515.
- Rosa, J.M. da, Arioli, C.J., Nunes-Silva, P., Garcia, F.R.M., 2019. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação? *Revista de Ciências Agroveterinárias* 18, 154–162.

- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96–S119.
- Santos-Junior, V.C. dos, 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.
- Santos-Junior, V.C. dos, Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F.L., Tavares, W. de S., 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.
- Sara Varghese, T., Biju Mathew, T., 2013. Bioefficacy and safety evaluation of newer insecticides and acaricides against chilli thrips and mites. *Journal of Tropical Agriculture*. 51, 111–115.
- Simone-Finstrom, M., 2016. Proceedings of the 2017 American Bee Research Conference. *Bee World* 93(4), 104–127.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.
- Stokstad, E., 2007. The case of the empty hives. *Science* 316, 970–972.
- van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4: e6481.
- WSDA - Washington State Department of Agriculture, 2010. Pollinator protection requirements for section 18, Emergency exceptions and section 24(c), special local need registration in Washington State, AGR PUB 631-225.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6, e14720.
- Zhu, Y.C., Adamczyk, J., Rinderer, T., Yao, J., Danka, R.G., Luttrell, R., Gore, J., 2015. Spray toxicity and risk potential of 42 commonly used formulations of row crop pesticides to adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 108, 2640–2647.

## CAPÍTULO 2

### **Alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) causadas pelo fungicida azoxistrobina**

## 1. INTRODUÇÃO

Abelhas melíferas, *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), são insetos polinizadores importantes, especialmente em áreas de monocultura agrícola (Klein et al. 2008). No entanto, a perda de colônias tem sido relatada globalmente, principalmente durante o inverno (Brodschneider et al. 2016; Chauzat et al. 2016; Antúnez et al. 2017). O consenso atual a respeito do declínio nas espécies de abelhas é a causa multifatorial, incluindo mudanças climáticas, destruição de habitats, manejo inadequado, patógenos, parasitas, e pesticidas (Ratnieks & Carreck, 2010). Os pesticidas podem atingir a colônia através da coleta de pólen, néctar e água contaminados (Devillers & Pham-Delègue, 2002). Há relatos que o uso indiscriminado de diferentes pesticidas pode resultar em uma redução drástica de insetos benéficos, incluindo abelhas (Ostiguy et al., 2019).

Dentre os pesticidas, os fungicidas são frequentemente utilizados em cultivos agrícolas, inclusive na época da floração, por serem considerados seguros para abelhas. No entanto, estudos recentes acusam a presença de resíduos de fungicidas no pólen (Charlton and Jones, 2007; Smodiš Škerl et al., 2009; Mullin et al., 2010), que é a principal fonte proteica para as abelhas, o que pode ter impacto nos fungos simbiotes e benéficos que estão presentes nas colônias, especialmente durante o processamento do pólen, que é requisito essencial do desenvolvimento da larva (Gilliam et al., 1989). O desbalanço da microflora por alteração do seu crescimento ou mortalidade de grupos de fungos pode permitir o desenvolvimento de fungos indesejáveis, incluindo patógenos. Assim, pode haver mudanças na composição fúngica, afetando a transformação do pólen em pão de abelha (Yoder et al., 2008).

Além de alimento larval, os grãos de pólen são a principal fonte de proteínas para as operárias adultas, especialmente aquelas envolvidas na produção da geleia real para alimentação larval e das rainhas (Michener, 1974).

Além do desbalanço da microflora, estudos conduzidos com *A. mellifera* indicam que fungicidas podem ser letais para adultos e larvas ou causar modificações comportamentais e fisiológicas (Kubik et al., 1999; Mussen et al., 2004; Ladurner et al., 2005, 2008; Alarcón et al., 2009; Smodiš Škerl et al., 2009). Ao contrário de inseticidas que geralmente alteram funções neurais, fungicidas podem afetar ácidos nucleicos, síntese de proteínas, estrutura da membrana celular, respiração e mitose (Yang et al., 2011). Fungicidas que comprometem funções mitocondriais também podem suprimir a imunidade, já que a sinalização imunológica é

impulsionada por funções metabólicas básicas do indivíduo, como consumo de oxigênio, produção de ATP e possíveis vias biossintéticas que dependem da atividade mitocondrial (Arnoult et al., 2009). Apesar disso, efeitos subletais de fungicidas que afetam a função de órgãos de abelhas têm sido pouco estudados.

Dentre os órgãos das abelhas, o intestino médio é responsável pela digestão e absorção de nutrientes, além de funcionar como uma barreira à xenobióticos, sendo um alvo indireto de pesticidas, acarretando necrose celular, desestruturação da matriz peritrófica e alterações em organelas, prejudicando a realização de tarefas e diminuindo a duração do tempo de vida dos indivíduos (Mao et al., 2011).

Fungicida amplamente utilizado, azoxistrobina é do grupo químico das estrobilurinas, de largo espectro e eficaz no controle de doenças das culturas do café, algodão, cana-de-açúcar, soja e trigo. As estrobilurinas são um grupo de compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus* (Pers.) Singer (Physalacriaceae), que fazem parte do grupo dos inibidores QoI, cuja toxicidade advém da inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo mitocondrial III, impedindo a transferência de elétrons na mitocôndria (Loiseleur, 2017). Sua baixa toxicidade aguda para abelhas permite sua utilização irrestrita, acarretando possíveis efeitos subletais de difícil observação.

Considerando a larga utilização da azoxistrobina e detecções de seus resíduos em indivíduos de *A. mellifera* e no pólen estocado nas colônias dessa abelha (Hladik et al., 2016; Ostiguy et al., 2019), é necessário testar os efeitos desse composto químico em órgãos não-alvos, como o intestino médio. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças histológicas e citológicas do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera* causadas pela azoxistrobina via ingestão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Abelhas**

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* foram obtidas de quadros de cria de cinco colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 32 °C e 60-80% de umidade relativa, alimentadas com mel e pólen fermentado, ad libitum, por três dias anteriores aos experimentos.

## 2.2. Teste-limite

O teste-limite, conforme protocolo da 'Organisation for Economic Co-operation and Development' (OECD, 1998; Fischer & Moriarty, 2014), foi utilizado para verificar que a azoxistrobina (Priori® SC 250 g L<sup>-1</sup>, São Paulo, SP, Brasil) apresenta dose letal >100 µg/abelha. Essa dose foi administrada para grupos de 10 abelhas de três dias de idade, em solução de sacarose a 50% (m/v) ad libitum, enquanto o grupo controle foi alimentado apenas com a solução de sacarose. Os testes foram realizados em triplicata e a mortalidade de cada grupo foi avaliada após 4 h, 12 h, 24 h e 48 h. Constatada a não mortalidade durante o teste-limite, e no intuito de se obter um cenário realista de exposição em campo, foi escolhida a dose comercial máxima de 400 mL p. c./ha (Priori®, 250 g i.a./L) indicada pelo fabricante do produto para o combate de pragas. O cálculo da exposição para abelhas foi determinado pela conversão da dose máxima de aplicação para uma taxa de produto/cm<sup>2</sup> (Davis & Williams, 1990), resultando em uma dose de 1 µg i. a./abelha.

## 2.3. Exposição

Uma solução estoque da concentração calculada foi preparada em sacarose a 50% e alíquotas foram colocadas em microtubos de plástico, estimando-se o consumo de 33 µL/abelha/dia (Decourtye et al., 2003; 2005), e uma exposição de 1 µg i.a./abelha de espiromesifeno. O primeiro e segundo grupos receberam espiromesifeno por 24 h e 48 h respectivamente, enquanto o terceiro e quarto grupos receberam apenas solução de sacarose por 24 h e 48 h. Para cada grupo, foram alimentadas 60 abelhas divididas em seis potes de plástico de 250 mL, contabilizando 10 abelhas por pote (Medrzycki et al., 2013).

## 2.3. Microscopia de Luz

Quinze operárias tratadas com azoxistrobina e 15 do grupo controle, após 24 h e 48 h de exposição, foram anestesiadas a -4°C por 3 minutos, o intestino médio dissecado em solução salina para insetos (0,1 M NaCl + 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e transferido para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h a 5°C. As amostras foram desidratadas em gradiente de etanol (70°, 80°, 90° e 95°) e embebidas em historesina (Leica Biosystem Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Seções com 2,5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo, coradas com hematoxilina e eosina. Algumas seções histológicas foram submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol para detecção de proteínas totais (Bancroft &

Gamble, 2008). As amostras foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

#### **2.4. Ultraestrutura**

Dez abelhas tratadas com azoxistrobina e 10 do grupo controle, após 24 h e 48 h de exposição, foram dissecadas e os intestinos médios separados e transferidos para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2, contendo 0,2 M de sacarose por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio por 2 h, e lavadas no mesmo tampão, seguindo desidratação em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99°). As amostras foram embebidas em resina LR White (London Resin Company Ltd.) e as seções ultrafinas (80-90 nm de espessura), obtidas com navalha de vidro em ultramicrótomo PowerTomes PT-X (RMC Boeckeler Instruments Inc., Tucson, AZ, USA), foram 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).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Teste-Limite**

O teste-limite não apresentou mortalidade para as abelhas nos grupos controle e tratamento, indicando que a  $DL_{50}$  da azoxistrobina é maior que 100  $\mu\text{g}/\text{i.a.}/\text{abelha}$ .

#### **3.2. Histopatologia**

Não houve diferença morfológica entre os períodos de 24 h e 48 h do grupo controle. O epitélio do intestino médio das operárias de *A. mellifera* consistiu de uma camada única de células digestivas prismáticas (Fig. 1A) com núcleos arredondados (Fig. 2B). A porção basal do epitélio apresentou ninhos de células regenerativas (Fig. 1B) e camadas de matriz peritrófica delimitavam o lúmen (Fig. 1B). As fibras musculares encontravam-se distribuídas em camadas circulares e longitudinais (Figs. 1A e 1B).

Após 24 h da exposição à azoxistrobina, o intestino médio das operárias de *A. mellifera* apresentou desarranjo da camada de células do epitélio, com alta vacuolização citoplasmática e aumento na produção de secreção apócrina (Fig. 2A). Após 48 h da exposição, houve

formação de espaços vazios entre as células (Fig. 2B) e liberação de conteúdo citoplasmático para o lúmen (Fig. 3C), algumas contendo o núcleo celular (Fig. 2D).

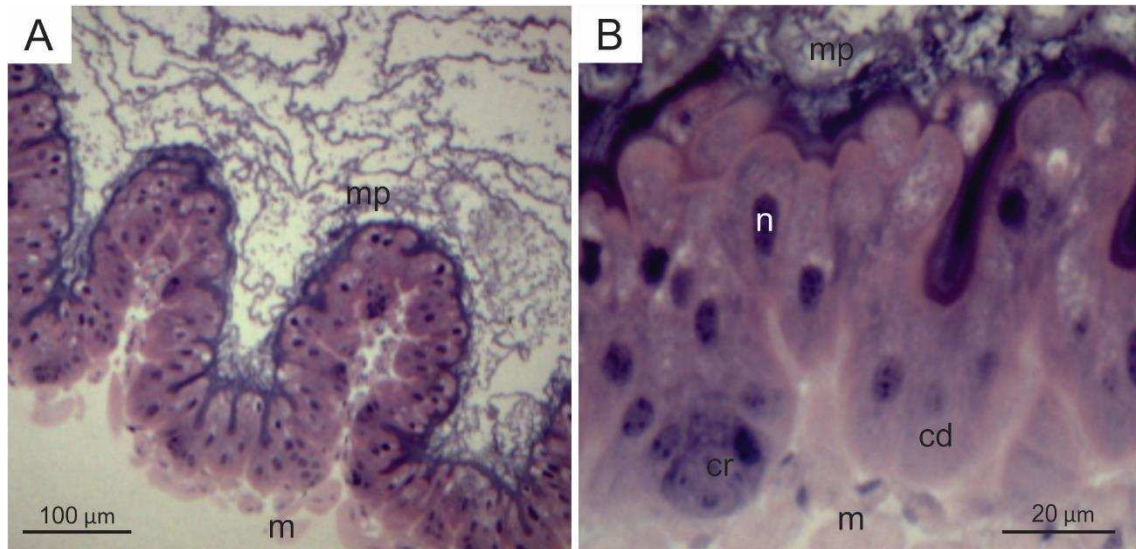


Figura 1. Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera* do grupo controle. A: visão geral do epitélio revestido externamente por uma camada muscular (m) e matriz peritrófica (mp) que limita o lúmen. B: epitélio contendo ninhos células regenerativas na base (cr), células digestivas colunares (cd) com núcleos (n) bem desenvolvidos

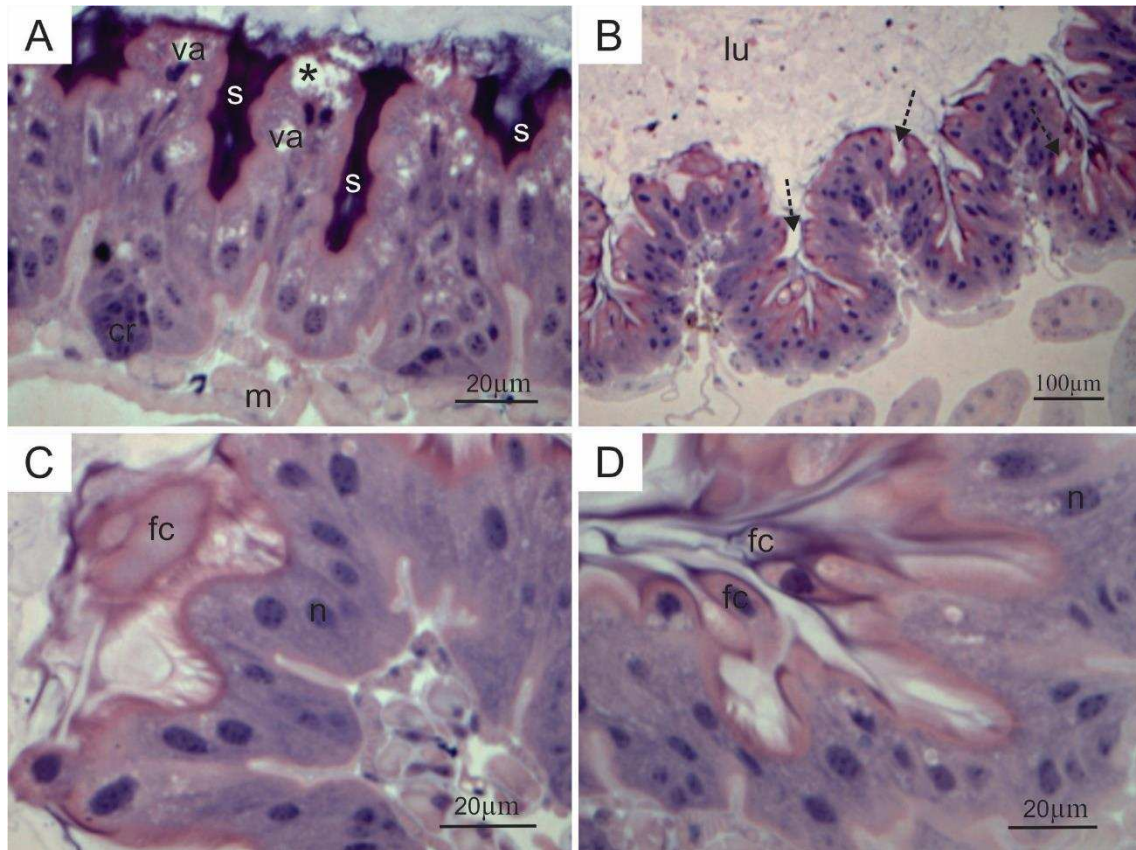


Figura 2. Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera* expostos à azoxistrobina por 24h (A) e 48h (BCD). A: Epitélio apresentando desestruturação (\*) e vacúolos (va), com intensa liberação de secreção (s). B: Visão geral do epitélio apresentando espaços vazios (seta pontilhada). C: fragmento citoplasmático liberado no lúmen (fc). D: fragmentos celulares com núcleo liberado no lúmen (fc).

O teste para detecção de proteínas mostrou maior intensidade de coloração nos ninhos de células regenerativas do epitélio após 24 h de exposição à azoxistrobina (Fig. 3), não ocorrendo alteração no tratamento de 48h em relação ao controle.

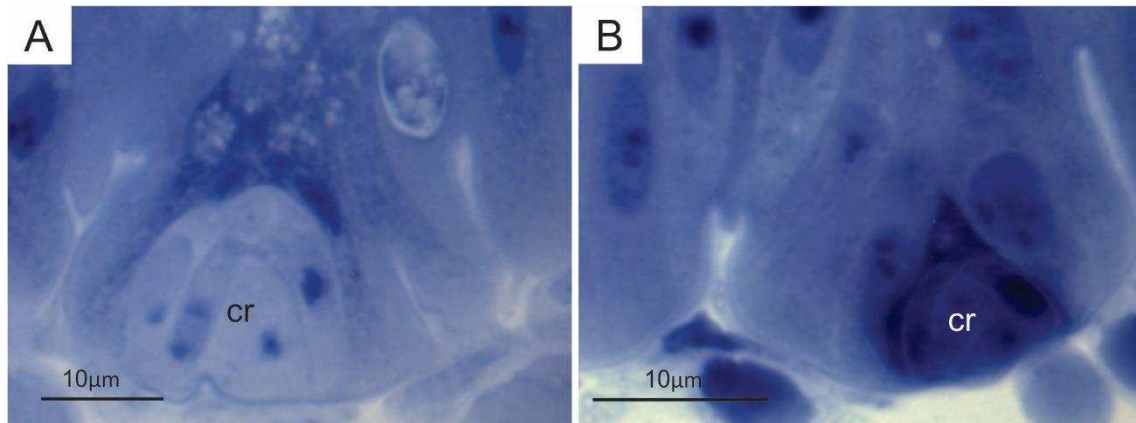


Figura 3: Fotomicrografias do intestino médio de *Apis mellifera* sob a técnica de mercúrio-bromofenol mostrando a diferença de intensidade na coloração das proteínas nos ninhos de células regenerativas (cr). A: Epitélio do grupo controle, apresentando ninhos de células regenerativas pouco coradas. B: Epitélio do grupo de tratamento exposto por 24 h à azoxistrobina, apresentando ninhos de células regenerativas intensamente coradas. m = músculo. mp = matriz peritrófica.

### 3.3. Citotoxicidade

As células digestivas do intestino médio das abelhas do grupo controle apresentaram a superfície apical com microvilosidades desenvolvidas e o citoplasma subjacente rico em mitocôndrias e com algumas vesículas elétron-transparentes (Fig. 4A). A região perinuclear continha retículo endoplasmático rugoso organizado em cisternas achatadas e o núcleo teve predomínio de cromatina descondensada com nucléolo bem desenvolvido (Fig. 4B). A região basal apresentou invaginações da membrana plasmática formando labirinto basal com canais extracelulares dilatados com algumas figuras mielínicas e vesículas elétron-transparentes (Fig. 4C),

Após 24h da exposição à azoxistrobina, ocorreram mudanças nas células digestivas, com degeneração do citoplasma (Fig. 5A), núcleo com grumos de cromatina condensada (Fig 5. A e B), mitocôndrias com interior eletro-transparente (Fig. 5B), retículo endoplasmático vesicular (Fig. 5B, 5C e 5D), e regiões com ausência de labirinto basal (Fig 5D). Após 48h da exposição à azoxistrobina houve aumento na quantidade de vacúolos, principalmente nos ápices das células (Fig. 6).

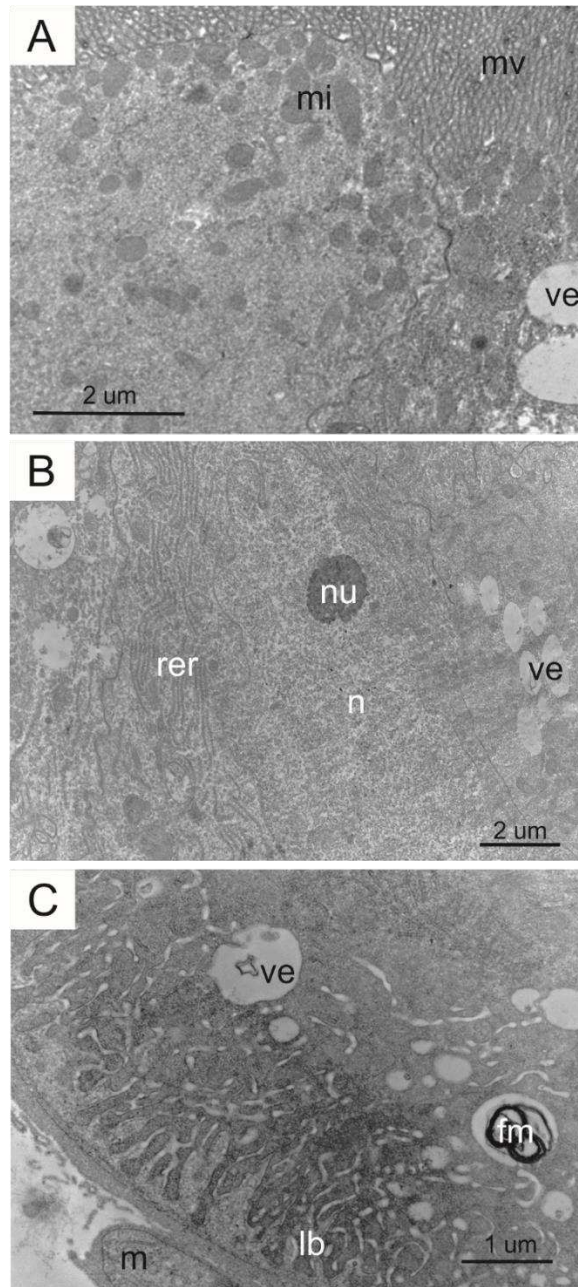


Figura 4: Eletromicrografia das células digestivas do intestino médio de *Apis mellifera*. A: porção apical das células digestivas contendo microvilosidades (mv), numerosas mitocôndrias (mi) e algumas vesículas de secreção elétron-transparentes (ve). B: porção mediana com núcleo (n) e nucléolo (nu) e citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (rer). C: porção basal com labirinto basal (lb) com canais largos, figura mielínica (fm), e algumas vesículas (ve). mb – membrana basal. m - músculo.

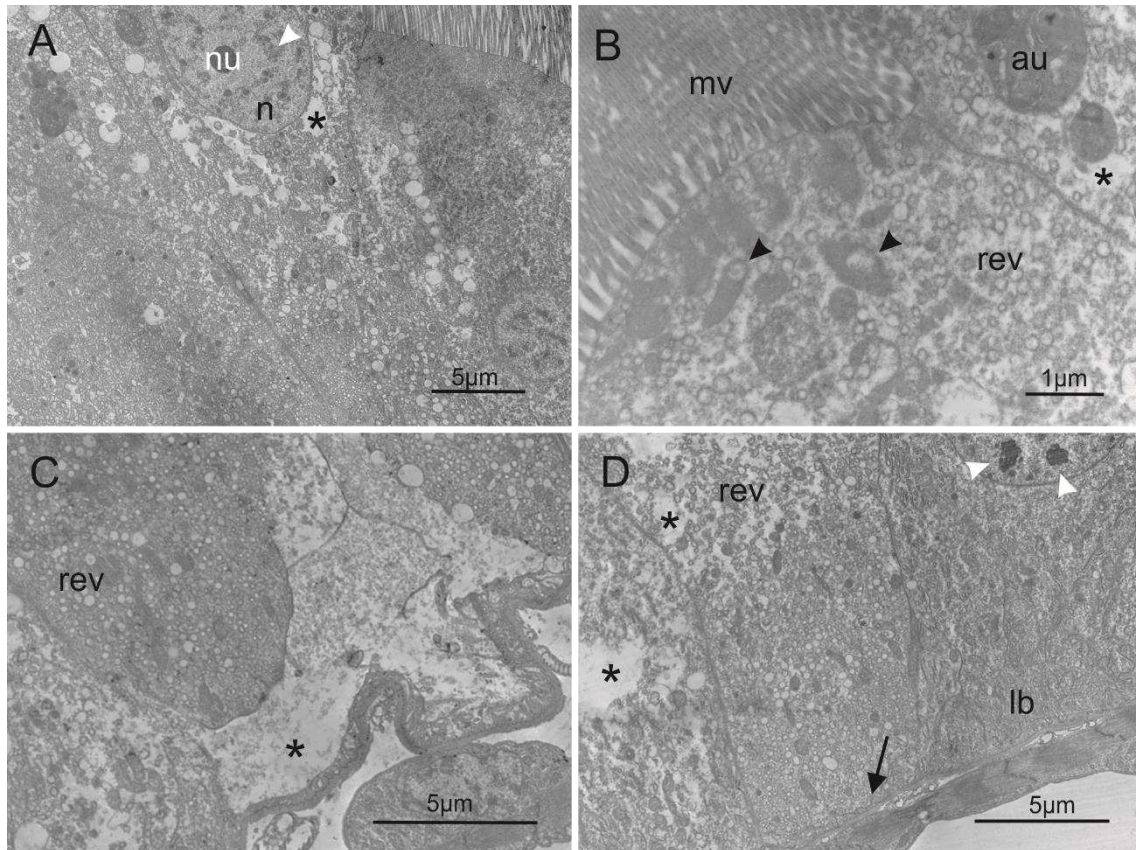


Figura 5. A: Eletromicrografia do intestino médio de *Apis mellifera* exposto ao fungicida azoxistrobina por 24h. A: Região apical mostrando intensa degeneração citoplasmática (\*), núcleo (n) e nucléolo (nu) com grumos de cromatina condensada (cabeça de seta branca). B. Porção basal apresentando forte degeneração do citoplasma (\*) e retículo endoplasmático vesicular (rev). C: Região apical apresentando mitocôndrias com sinais de degeneração (cabeça de seta preta.), retículo endoplasmático vesicular (rev) e degeneração citoplasmática (\*). Microvilosidades (mv) e autofagossomos (au). D: Região basal apresentando ausência de labirinto basal (seta), retículo endoplasmático vesicular (rev), degeneração citoplasmática (\*) e grumos de cromatina condensada (cabeça de seta branca).

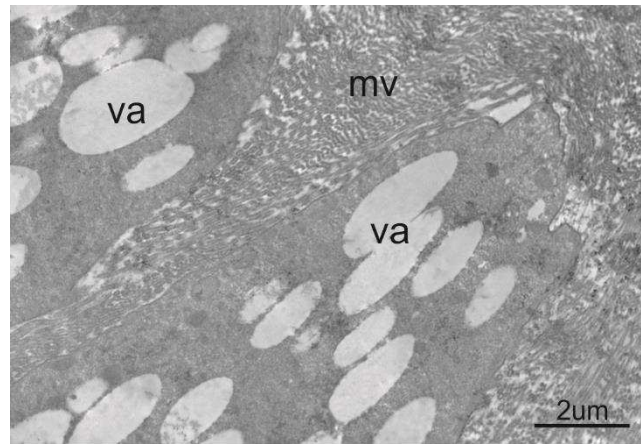


Figura 6. Eletromicrografia do intestino médio de *Apis mellifera* exposto ao fungicida azoxistrobina por 48h. Ápice das células digestivas apresentando grande quantidade de vacúolos (va). Microvilosidades (mv).

#### 4. DISCUSSÃO

O teste-limite acusou ausência de mortalidade nas abelhas operárias, confirmando uma  $DL_{50}$  de mais de  $100\mu\text{g}/\text{abelha}$  e classificando a azoxistrobina como não tóxica para *A. mellifera*. Valores semelhantes são encontrados em relatórios de agências reguladoras dos pesticidas (EPA, 2008; EFSA, 2010). No entanto, a interação da azoxistrobina com outros fungicidas, como boscalide, iprodiona e piraclostrobina diminui a sobrevivência de operárias forrageadoras, principalmente durante o inverno, em que há diminuição dos processos imunológicos (Steinmann, et al., 2015). Sinergismo de fungicidas com outros pesticidas tem sido reportado causando danos nas glândulas hipofaríngeas (Zaluski et al., 2017), mudanças comportamentais e diminuição da longevidade de abelhas (Tadei et al., 2019). O fungicida propiconazole, isolado ou em combinação com acetamiprida também causa aumento da mortalidade em operárias adultas de *Apis cerana* (Han et al., 2019).

O desarranjo do epitélio do intestino médio das abelhas alimentadas com azoxistrobina, caracterizado pelos espaços vazios, pode ser uma indicação de morte celular. As protrusões citoplasmáticas e fragmentação celular podem estar relacionados com a degeneração do retículo endoplasmático (Aki et al., 2012), alterações no citoesqueleto e morte celular necrótica (Doonan & Cotter, 2008). Tal fenômeno foi observado no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* exposto ao malation, deltametrina e tiametoxam (Kakamand et al., 2008). Relacionado também à desorganização do epitélio, o aumento da vacuolização alarga espaços intracelulares, como reportado em larvas de *A. mellifera* submetidas ao tratamento com ácido bórico (Cruz et al., 2010). A vacuolização está frequentemente associada à contaminação por

xenobióticos, acompanhada por degeneração do tecido e liberação de células no lúmen do intestino médio (Oliveira et al., 2012; Carneiro et al., 2019; Santos-Junior et al., 2020).

O aumento da secreção apócrina após 24h de exposição à azoxistrobina, seguida pela sua redução após 48h é um fenômeno semelhante ao ocorrido no intestino médio do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera) sob influência da permetrina (Martínez et al., 2018), o que pode indicar uma tentativa de neutralizar os efeitos do composto durante o primeiro dia de exposição. É possível que a secreção apócrina contenha enzimas digestivas necessárias para desintoxicação de xenobióticos (Ferreira et al., 1990; Aumüller et al., 1999; Oliveira et al., 2012; Martínez et al., 2019).

A maior concentração de proteínas na região de ninhos de células regenerativas do epitélio do intestino médio de abelhas tratadas com azoxistrobina, indica aumento de metabolismo proteico nesse local com possível diferenciação em novas células digestivas. Já a região do ninho de células regenerativas do epitélio da abelha tratada com espiromesifeno não apresentou intensidade de coloração (Capítulo 1). Essa diferença indica que a resiliência do tecido perante a toxicidade dos xenobióticos pode acarretar em aumento ou diminuição de diferenciação de células regenerativas. Por um lado, efeitos tóxicos aumentam a intensidade de diferenciação ao aumentar a demanda de substituição de células, comprometendo a longevidade do tecido e por outro lado, as toxinas podem afetar diretamente as células regenerativas, diminuindo sua capacidade regenerativa (Forkpah et al., 2014).

A análise ultraestrutural mostra a ocorrência de lesões nas mitocôndrias após 24h do tratamento com azoxistrobina, que podem ter sido induzidas por meios do modo de ação desse químico, que bloqueia a cadeia de transporte de elétrons inibindo a síntese de ATP (Bartlett et al. 2002). Esse composto também induz o estresse oxidativo pela liberação de elétrons do processo de respiração (Kim et al. 2007). Os núcleos apresentam grumos de cromatina condensada e o retículo endoplasmático adquire forma substancialmente vesicular, uma possível resposta compensatória (Köhler & Triesbskorn 1998). Todas essas alterações ultraestruturais encontradas nas células digestivas das abelhas alimentadas com azoxistrobina tem sido atribuídas como características de morte celular por necrose e apoptose (Elmore, 2007; Proskuryakov et al., 2003; Moraes & Bowen, 2000).

A ausência do labirinto basal em algumas células digestivas do intestino médio de abelhas alimentadas com azoxistrobina é semelhante ao que ocorre nas células dos Túbulos de

Malpighi de *A. mellifera* expostas aos inseticidas tiametoxam (Catae et al., 2014) e imidacloprida (Rossi et al., 2013) bem como ao alargamento dos canais extracelulares do labirinto basal (Fiaz et al., 2019; Santos-Junior et al., 2020). Alterações no labirinto basal das células sugerem degeneração do tecido, que potencialmente compromete a reabsorção e excreção de substâncias (Rossi et al., 2013).

As consequências aqui relatadas indicam que o fungicida azoxistrobina não é totalmente seguro para as abelhas, apesar da sua baixa toxicidade aguda. Sugere-se que este pesticida seja investigado e que sejam exploradas medidas para minimizar seu efeito nocivo em insetos não-alvos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aki, T., Nara, A., & Uemura, K., 2012. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology* 28(3), 125–131.
- Alarcón, R., DeGrandi-Hoffman, G., Wardell, G., 2009. Fungicides can reduce, hinder pollination potential of honey bees. *Western Farm Press* 31: 17–21.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D., Zunino, P., 2017. Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie* 48 (3), 364–370.
- Arnoult, D., Carneiro, L., Tattoli, I., Girardin, S. E., 2009. The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. *Seminars in Immunology* 21(4), 223–232.
- Bancroft, J.D., Gamble, M., 2008. *Theory and practice of histological techniques*. London, Churchill Livingstone.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649–662.
- Brodtschneider, R., Gray, A., van der Zee, R., Adjlane, N., Brusbardis, V., Charrière, J. D., Woehl, S., 2016. Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* 55(5), 375–378.
- Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., Serrão, J. E., 2019. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, 109991.
- 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(4), 274–281.
- Charlton, A. J. A., Jones, A., 2007. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1141 (1):117–122.
- Chauzat, M.P., Bougeard, S., Hendrikx, P., Ribière- Chabert, M., 2016. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie* 47 (3), 348–378.
- Cruz, A. D. S., Silva-Zacarin, E. C. M. da, Bueno, O. C., & Malaspina, O., 2010. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biology and Toxicology* 26(2), 165–176.
- Davis, B. N. K., Williams, C.T., 1990. Buffer zone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. *Environmental Pollution* 63, 247–259.

- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 242–250.
- Decourtye, A., Lacassie, E., Pham-Delégue, M.H., 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science* 59, 269–278.
- Devillers, J., Pham-Delègue, M.H., 2002. *Honey Bees : Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Londres: Taylor & Francis.
- Doonan, F., & Cotter, T. G., 2008. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44(3), 200–204.
- EFSA, 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin. *EFSA Journal* 8(4), 2010.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicology Pathology* 35, 495–516.
- EPA, 2008. Pesticide Fact Sheet Name of Chemical: Azoxystrobin. {[http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-090100\\_01-Apr-08.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-090100_01-Apr-08.pdf)} Acessado em Novembro 2019.
- 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 (8), 839e847.
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., de Souza, D. L. L., Cossolin, J. F. S., Carvalho, P., Martins, G., Serrão, J. E., 2019. Pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, damages midgut cells and interferes with behaviors of *Aedes aegypti* larvae. *PeerJ* 7, e7489.
- Forkpah, C., Dixon, L. R., Fahrbach, S. E., Rueppell, O., 2014. Xenobiotic effects on intestinal stem cell proliferation in adult honey bee (*Apis mellifera* L) workers. *PLoS ONE* 9(3), 1–9.
- Gilliam, M., D.B. Prest, B.J. Lorenz, 1989. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie* 20: 53-68.
- Han, W., Yang, Y., Gao, J., Zhao, D., Ren, C., Wang, S., Zhong, Y., 2019. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. *Ecotoxicology* 28(4), 399–411.
- Hladik, M. L., Vandever, M., Smalling, K. L., 2016. Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Science of the Total Environment* 542, 469–477.
- 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(1), 144–151.

- Kim, J. H., Campbell, B. C., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., May, G. S., 2007. Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response. *Letters in Applied Microbiology* 45(2), 134–141.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274(1608), 303–313.
- Köhler, H. R., Triebkorn, R., 1998. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers* 3(2), 109–127.
- Kubik, M., Nowacki, J., Pidek, A., Warakomska, Z., Michalczyk, L., Goszczynski, W., 1999. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie* 30, 521–532.
- Ladurner, E., Bosch, J., Kemp, W. P., & Maini, S., 2005. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie* 36, 449–460.
- Ladurner, E., Bosch, J., Kemp, W. P., & Maini, S., 2008. Foraging and nesting behavior of *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae) in the presence of fungicides: cage studies. *Journal of Economic Entomology* 101(3), 647–653.
- Loiseleur, O., 2017. Natural products in the discovery of agrochemicals. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 71(12), 810–822.
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Freire, A. F. P. A., Zanuncio, J. C., Bozdoğan, H., Serrão, J. E., 2019. Toxicity and cytotoxicity of the insecticide imidacloprid in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 167, 69–75.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Neves, G. da S., 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.
- Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L.P., Chauzat, M., et al., 2013. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52, 1–60.
- Moraes, R.L.S., Bowen, I.D., 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biology International* 24, 737–743.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D., Pettis, J. S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5, e9754.
- Mussen, E. C., Lopez, J. E., Peng, C. Y. S., 2004. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Entomology* 33(5), 1151–1154.

- Oliveira, R. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., & Malaspina, O., 2012. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Toxicology* 1123–1133.
- Ostiguy, N., Drummond, F. A., Aronstein, K., Eitzer, B., Ellis, J. D., Spivak, M., Sheppard, W. S., 2019. Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study. *Insects* 10(1), 1–34.
- Ostiguy, N., Drummond, F. A., Aronstein, K., Eitzer, B., Ellis, J. D., Spivak, M., Sheppard, W. S., 2019. Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study. *Insects* 10(1), 1–34.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283, 1–16.
- Ratnieks, F. L. W., Carreck, N. L., 2010. Clarity on honey bee collapse? *Science* 327(5962), 152–153.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208–212.
- Rossi, C. de A., Roat, T. C., Tavares, D. A., Cintra-Socolowski, P., Malaspina, O., 2013. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Microscopy Research and Technique* 76(5), 552–558.
- Santos-Junior, V. C. dos, Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F. L., Tavares, W. de S., 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.
- Santos-Junior, V. C. dos, Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Fernandes, F. L., Tavares, W. de S., 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.
- Smodis Skerl, M. I., Velikonja Bolta, S., Basa Cesnik, H., Gregorc, A., 2009. Residues of Pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 374–377.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., Dainat, B., 2015. Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PLoS ONE* 10(6), 1–18.
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., Gan, Y., 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* 1–8.

Yoder, J. A., Christensen, B. S., Croxall, T. J., Tank, J. L., Sammataro, D., 2008. Suppression of growth rate of colony-associated fungi by high fructose corn syrup feeding supplement, formic acid, and oxalic acid. *Journal of Apicultural Research* 47(2), 126–130.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os danos ao intestino médio de *A. mellifera* aqui relatados para espiromesifeno e azoxistrobina afetam a digestão e absorção de nutrientes, com potencial para diminuir a imunidade e longevidade do inseto, assim como compromete a integridade da primeira barreira contra patógenos. Portanto, a baixa toxicidade aguda dos pesticidas não é a única característica importante sob a perspectiva de conservação das abelhas e outros insetos benéficos visto que esses compostos apresentam efeitos colaterais pronunciados em órgãos não-alvos.

Sendo o espiromesifeno e a azoxistrobina dois importantes pesticidas empregados em lavouras visitados por abelhas, este estudo contribui para o conhecimento a respeito dos efeitos colaterais não letais advindos de sua utilização. A ocorrência de danos ao intestino médio em *A. mellifera* é uma importante indicação de estas e outras consequências devem ser investigadas para garantir que a utilização destes pesticidas, se necessária, seja segura para as abelhas, evitando-se a aplicação durante a floração.