

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA MOTTA

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO TIAMETOXAM EM ABELHAS
NATIVAS: HISTOPATOLOGIA, ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS EM *Partamona helleri***

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

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA - MINAS
GERAIS 2024**

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

T

M921e
2024

Motta, João Victor de Oliveira, 1999-

Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam em abelhas nativas: histopatologia, estresse oxidativo e alterações comportamentais em *Partamona helleri* / João Victor de Oliveira Motta. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (54 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2024.

Referências bibliográficas: f. 36-54.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.519>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Histopatologia. 2. Abelhas - Comportamento. 3. Tiametoxam (Inseticida). 4. Polinizadores. 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. 595.79

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA MOTTA


**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DO TIAMETOXAM EM ABELHAS
NATIVAS: HISTOPATOLOGIA, ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS EM *Partamona helleri***

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


Orientador: José Eduardo Serrão

APROVADA: 14 de agosto de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **JOAO VICTOR DE OLIVEIRA MOTTA**
Data: 21/08/2024 13:32:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

João Victor de Oliveira
Motta Autor

Documento assinado digitalmente
 **JOSE EDUARDO SERRAO**
Data: 21/08/2024 14:41:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Eduardo
Serrão Orientador

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, minha mãe Alexandra, minha vó Tita, meus tios Ju e Aline, minha namorada Isabella, meus amigos de Viçosa e da república Valhalla pelo apoio e esforços realizados para que eu pudesse chegar tão longe e alcançar meus objetivos

A Universidade Federal de Viçosa e seus funcionários pela estrutura e acolhimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro para a pesquisa.

Aos professores e técnicos do Departamento de Biologia Geral que de alguma forma acrescentaram a minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular e ao nosso orientador José Eduardo Serrão pela confiança, apoio, conselhos e disponibilidade nesses anos, não apenas de mestrado, mas desde a graduação.

Obrigado!

RESUMO

MOTTA, João Victor de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2024.

Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam em abelhas nativas: Histopatologia, estresse oxidativo e alterações comportamentais em *Partamona helleri*. Orientador: José Eduardo Serrão.

As abelhas são polinizadores de plantas nativas e cultivadas em todo o mundo. Todavia, vários fatores estão colaborando para a diminuição de suas populações nos últimos anos, com destaque para o crescente uso de inseticidas na agricultura. Tiametoxam é um neonicotinóide neurotóxico, que se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina, ocasionando hiperexcitação, paralisia e morte dos insetos. Apesar do alvo do tiametoxam ser o sistema nervoso, ele pode afetar outros órgãos através da ingestão, como o intestino médio, afetando insetos não alvos, como as abelhas. *Partamona helleri* é uma abelha sem ferrão, polinizadora de diversas famílias botânicas nativas e cultivadas, podendo estar exposta a concentrações subletais de tiametoxam. Este estudo avaliou os efeitos colaterais da exposição oral crônica ao tiametoxam no intestino médio, estresse oxidativo e comportamento de operárias de *P. helleri*. As abelhas foram expostas oralmente, por 7 dias, à concentração de tiametoxam encontrada em grãos de pólen (0,06 ng/g). Os resultados demonstram alterações no epitélio do intestino médio das operárias tratadas com tiametoxam como vacuolização citoplasmática, protusões celulares, aumento de secreção apócrina, danos mitocondriais, decréscimo de proteínas e polissacarídeos neutros e presença de células em autofagia e apoptose. O tiametoxam também induz estresse oxidativo, evidenciado por alterações nas atividades de enzimas e marcadores antioxidantes. Por fim, o tiametoxam afeta o comportamento da abelha, diminuindo a distância percorrida e velocidade de caminamento desse inseto. Os resultados indicam que a exposição de operárias de *P. helleri* à concentração campo realista de tiametoxam compromete diversos aspectos fisiológicos do inseto e o desempenho de funções essenciais para colônia com possíveis efeitos na polinização.

Palavras chaves: Inseticida; Histopatologia; Polinizadores.

ABSTRACT

MOTTA, João Victor de Oliveira, M.Sc., Federal University of Viçosa, August 2024.

Effects of sublethal concentrations of thiamethoxam on wild bees: Histopathology, oxidative stress and behavioral changes in *Partamona helleri*. Adviser: José Eduardo Serrão.

Bees are pollinators of native and cultivated plants around the world. However, several factors are contributing to the increase in their populations in recent years, with emphasis on the increasing use of insecticides in agriculture. Thiamethoxam is a neonicotinoid neurotoxicant, which binds to nicotinic acetylcholine receptors, causing hyperexcitation, paralysis and death of insects. Although thiamethoxam's target is the nervous system, it can affect other organs through ingestion, such as the midgut, affecting non-target insects such as bees. *Partamona helleri* is an iron-free bee, pollinator of several native and cultivated botanical families, and can be exposed to sublethal concentrations of thiamethoxam. This study evaluated the side effects of chronic oral exposure to thiamethoxam on the midgut, oxidative stress and behavior of *P. helleri* workers. The bees were exposed orally, for 7 days, to the concentration of thiamethoxam found in pollen grains (0.06 ng/g). The results demonstrate changes in the midgut epithelium of workers treated with thiamethoxam, such as cytoplasmic vacuolation, cellular protrusions, increased apocrine transfer, mitochondrial damage, decreased proteins and neutral polysaccharides and the presence of cells undergoing autophagy and apoptosis. Thiamethoxam also induces oxidative stress, evidenced by changes in the activities of enzymes and antioxidant markers. Finally, thiamethoxam affects the bee's behavior, driving the distance covered and walking speed of this insect. The results indicate that the exposure of *P. helleri* workers in the realistic thiamethoxam concentration field involves several physiological aspects of the insect and the performance of essential functions for the colony with possible effects on pollination.

Keywords: Insecticide; Histopathology; Pollinators.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	
36 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 90% das plantas com flores são polinizadas por animais (Klein et al., 2018), demonstrando a importância dos serviços de polinização para a manutenção da biodiversidade e da produção agrícola, uma vez que cerca de 30% da produção global de alimentos é proveniente de culturas que dependem de polinizadores (Ollerton et al., 2011; Klein et al., 2018). Dentre os polinizadores, as abelhas se destacam como os principais em vários ecossistemas, sendo responsáveis por aproximadamente 50% dos serviços de polinização em plantas cultivadas (Rader et al., 2016).

As abelhas melíferas são polinizadoras fundamentais para a manutenção do equilíbrio ecológico (Alves-dos-Santos et al., 2016; Hung et al., 2018), sendo *Apis mellifera* amplamente utilizada na agricultura, com potencial de elevar o rendimento das culturas em até 95% (Breeze et al., 2011). Na região Neotropical, além das abelhas melíferas, os Meliponíneos possuem importante função ecossistêmica, polinizando até 90% da flora nativa (Morais et al., 2018).

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) possuem mais de 500 espécies, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (Grüter, 2020). *Partamona helleri* FRIESE 1900 é uma abelha sem ferrão Neotropical, com comportamento eussocial, formando colônias permanentes que variam de centenas a milhares de operárias (Michener, 2007). Essa abelha poliniza diversas famílias botânicas de importância econômica e alimentícia, como Poaceae, Fabaceae, Cucurbitaceae, Liliaceae, Myrtaceae e Solanaceae (Carvalho et al., 1999). Apesar de sua importância, as populações das abelhas apresentam declínio nos últimos anos (Padilha et al., 2019; Uhl & Bruhl 2019), com diminuição de 25% na diversidade de espécies desde 1990 (Zattara & Aizen, 2021). Esse declínio apresenta causas múltiplas, incluindo manejo inadequado, deficiências nutricionais, mudanças climáticas, perda de habitat, parasitas, patógenos e o excessivo uso de pesticidas (Yoder et al., 2013; Goulson et

al., 2015). Entretanto, o uso de pesticidas vem sendo apontado como o principal motivo para a diminuição na população das abelhas (Porrini et al., 2003; Siviter & Muth 2020).

Devido à alta demanda por alimentos, os pesticidas se tornaram indispensáveis na agricultura para o controle de insetos, fungos e ervas-daninhas (Popp et al., 2013). Porém, o uso indiscriminado destes químicos pode causar a contaminação do solo, água e ar, além de intoxicar organismos não-alvos (Verma e Bhardwaj, 2015).

Durante o forrageio, as abelhas podem ter vários contatos com pesticidas (Bonmatin et al., 2015; Zioga et al., 2020), através da exposição às gotículas em suspensão no ar, inalação durante ou após a pulverização ou ingestão de grãos de pólen, néctar, mel e água contaminados (Stoner, 2012; Sánchez-Bayo & Goka, 2014, Simon-Delso et al., 2014).

Entre os inseticidas, os neonicotinóides têm sido amplamente utilizados devido sua persistência ambiental, alta solubilidade em água e baixo custo (Matsuda et al., 2001). Eles possuem modo de ação sistêmico, sendo transportados para toda a planta e apresentando eficácia contra pragas, mesmo em pequenas concentrações (Simon-Delso et al., 2015).

Os neonicotinóides atuam no sistema nervoso dos insetos como moduladores competitivos do receptor nicotínico de acetilcolina nos neurônios, causando hiperexcitação, letargia, paralisia e morte (Simon-Delso et al., 2015; Matsuda et al., 2020; Carneiro et al., 2022). Apesar de apresentar baixa toxicidade para mamíferos (Wintermantel et al., 2020; Alsafran et al., 2022), esses químicos causam diversos danos em animais não-alvos, como as abelhas (Yang et al., 2008; Farder-Gomes et al., 2021).

Dentre os neonicotinóides, tiametoxam é um inseticida de segunda geração, utilizado em aplicações foliares e no tratamento de sementes (Oliveira et al., 2013) para o controle de pulgões, moscas-brancas, cigarrinhas, besouros e lagartas (Maienfisch et al., 2001). Considerando seu uso generalizado na agricultura, resíduos de tiametoxam (0,06 ng/g) foram encontrados em néctar e grãos de pólen de algumas plantas (Zioga et al., 2020), apontando

que abelhas podem ser afetadas por sua ingestão em ambiente natural. Após a ingestão, as moléculas de inseticidas chegam ao trato digestório, podendo afetar o epitélio do intestino médio e atravessar essa barreira, sendo distribuídos pela hemolinfa e podendo afetar outros órgãos (Denecke et al., 2018).

Nos insetos, o sistema digestório é dividido em três regiões, sendo o intestino anterior originado a partir do ectoderma, formado pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo, formado por epitélio simples e revestido por cutícula internamente (Chapman, 2013; Nation, 2022).

Após o intestino anterior, ocorre o médio, responsável pela digestão e absorção do alimento (Terra e Ferreira, 2020). Com origem no endoderma, seu epitélio é simples, constituído por células digestivas, endócrinas e regenerativas (Cavalcante e Cruz-Landim, 1999), apoiado sobre a lâmina basal e uma dupla camada de células musculares circulares e longitudinais (Caccia et al., 2019). As células mais abundantes são as digestivas, que secretam enzimas digestivas e componentes da matriz peritrófica, barreira multifuncional que envolve o alimento, além de realizar a absorção de nutrientes (Serrão e Cruz-Landim, 1996; Hegedus et al., 2009; Terra e Ferreira, 2020). Essas células são colunares com microvilosidades na superfície apical, ampliando a área de secreção e absorção (Terra e Ferreira, 2020). As células endócrinas são responsáveis pela produção e secreção de peptídeos hormonais no intestino médio (Santos et al., 2015; Christie, 2020), sendo encontradas na região basal, não chegando a atingir o lúmen, com o citoplasma rico em grânulos de secreção em sua região basal (Serrão e Cruz-Landim, 1996; Neves et al., 2003). As células regenerativas são encontradas ao longo de todo epitélio do intestino médio, formando ninhos na base do epitélio, responsáveis pela reposição das células digestivas e endócrinas (Martins et al., 2011; Fernandes et al., 2010; Dias et al. 2024). As células do intestino médio produzem uma estrutura acelular rica em proteoglicanos,

glicosaminoglicanos e quitina, denominada matriz peritrófica (Hegedus et al., 2009; Liu et al., 2019). Essa matriz protege o epitélio de choques mecânicos (Hegedus et al., 2009), infecções por microrganismos (Erlandson et al., 2019, Oliveira et al., 2022), toxinas (Guo et al., 2019) e auxilia na digestão (Bolognesi e al., 2008).

O intestino posterior é formado pelo piloro, íleo e reto, originado no ectoderma com epitélio revestido por cutícula fina e permeável, com função na reabsorção de água e íons (Nation, 2022).

Em abelhas expostas a inseticidas neurotóxicos, como neonicotinóides e piretroides, têm sido reportados danos ao intestino médio, com aumento da vacuolização citoplasmática e secreção apócrina, danos mitocondriais, desorganização da borda estriada e da matriz peritrófica (Cruz et al., 2009; Catae, et al., 2014; Serra et al., 2021; Farder-Gomes, et al., 2021, Carneiro et al., 2022). Além disso, há relatos nos quais o envenenamento por inseticidas ativa vias celulares de morte celular por autofagia, mediada por LC3 e por apoptose, mediada por caspases, no intestino médio de abelhas (Araújo et al. 2019, Farder-Gomes et al., 2021, Carneiro et al., 2022).

Além do intestino médio, outros órgãos podem sofrer danos devido a ingestão de inseticidas, a partir do momento em que ele atravessa a barreira do órgão, sendo distribuído pela hemolinfa (Dai et al., 2010; Catae et al., 2014; Delkash-Roudsari et al., 2020). Moléculas pequenas conseguem se difundir pela membrana plasmática das células do epitélio do intestino médio e atingir a hemolinfa, mas, no caso de moléculas maiores, o transporte é mediado por proteínas transportadoras transmembranas ou vesículas endocíticas (Denecke et al., 2018). Dentre os órgãos não-alvo com potencial de serem atingidos por pesticidas ingeridos, estão o corpo gorduroso, glândulas hipofaríngeas, cérebro e túbulos de Malpighi (Kakamand, 2008; Catae et al., 2014; Batista et al., 2020; Castro et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2021).

Além dos danos morfológicos em alguns órgãos, pesticidas podem induzir estresse oxidativo (Araújo et al., 2019; Farder-Gomes et al., 2021) e alterações comportamentais (Nicodemo et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2024) em insetos.

O estresse oxidativo favorece a formação de espécies reativas de oxigênio, oxidando biomoléculas e levando a perda de suas funções biológicas, comprometendo a homeostase de células e tecidos (Mittapalli et al., 2007). Para minimizar os danos oxidativos, os insetos transformam as moléculas de oxigênio reativo em peróxido de hidrogênio *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido (O_2^-), pela β -oxidação de ácidos graxos (Jameel et al., 2019) ou pela ação de enzimas oxidases, como a superóxido dismutase, catalases e glutathione S-transferase (Barreiros et al., 2006; Jameel et al., 2019).

Em abelhas, tem sido relatado que os inseticidas, após ingeridos, afetam o comportamento desses insetos, com redução da capacidade de aprendizagem e comunicação, paralisia, caminhada e voo (Bernardes et al., 2021; Farder-Gomes et al., 2024), o que pode prejudicar a atividade de forrageio, comprometendo a polinização e a capacidade de retorno à colônia.

2. OBJETIVO

Tendo em vista a importância dos insetos polinizadores e o uso indiscriminado de inseticidas, neste estudo foi analisado se a exposição oral crônica por 7 dias ao tiametoxam, na concentração residual encontrada em grãos de pólen, tem efeitos negativos em operárias de *P. helleri*. Para tanto, foram avaliadas a taxa de mortalidade, ocorrência de danos no epitélio do intestino médio, estresse oxidativo e alterações na locomoção desta abelha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

Operárias forrageadoras de *P. helleri* foram coletadas na entrada do ninho com auxílio de

tubos Erlenmeyer em três colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 75' S, 42° 86' O) e mantidas em laboratório a 29 ± 2 °C e umidade relativa de 80% (Farder-Gomes et al., 2024).

3.2. Exposição ao inseticida

A formulação comercial contendo tiametoxam (Cruiser 350 Fs; Syngenta, Basileia, Suíça; 350 g/L de ingrediente ativo e 830 g/L de outros ingredientes) foi comprada no mercado em 2023. Para obter a concentração aproximada de 0,06 ng/g encontrada em grãos de pólen (Zioga et al. 2020), 100 mL do produto comercial foi diluído em 900 mL de água destilada (solução 1), seguido de nova diluição de 5 µL da solução 1 em 1 L de água destilada (solução 2) e, por fim, 5 µL da solução 2 diluído em 1 L de sacarose a 50%. As abelhas foram mantidas em recipientes plásticos de 250 mL com perfurações para ventilação e tubos plásticos de 1,5 mL perfurados como alimentadores (Williams et al., 2013) sendo 10 abelhas por recipiente, em triplicata. O alimento foi disponibilizado para as abelhas por 7 dias e trocado diariamente para evitar contaminação por fungos e bactérias. As abelhas do grupo controle receberam apenas sacarose a 50% pelo mesmo período.

3.3. Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência foi realizada utilizando 10 abelhas de 3 colônias, com 30 abelhas por colônia, mantidas em recipientes plásticos como descrito acima, em triplicata. A mortalidade foi avaliada após 12 h e então a cada 24 h por 7 dias de exposição crônica ao tiametoxam. As abelhas mortas foram removidas e descartadas.

3.4. Histopatologia

Operárias de *P. helleri*, do grupo controle (n = 30) e alimentadas com a concentração de tiametoxam encontrada em grão de pólen (n = 30), como descrito acima, em triplicata, foram avaliadas após 7 dias de exposição. Cinco abelhas de cada pote plástico foram crioadestesiadas a 5 °C por 3 minutos, dissecados em NaCl 125 mM e tiveram seus intestinos

médios transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 48h, desidratados em solução crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e incluídos em historesina Leica conforme instruções do fabricante. Cortes com 3 µm de espessura, obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2245, foram corados com hematoxilina (15 min) e eosina (30 s), analisadas e fotografadas em microscópio de luz Olympus BX60.

3.4.1. Morfometria

Para determinar a altura da borda estriada do epitélio intestinal, 10 seções aleatórias de 10 intestinos médios do controle e tratamento foram fotografadas em lente objetiva 20X e abertura numérica 0,40 e a altura da borda estriada medida com o programa de computador Image J.

3.4.2. Índice de lesão de órgão

Cinco seções aleatórias de 10 intestinos médios do controle e do grupo tratamento foram analisadas em objetiva 40X e abertura numérica 0,75 para determinação do índice de lesão no epitélio do órgão de acordo com Reis et al. (2024). Brevemente, a soma das alterações histológicas no intestino médio foi calculada por abelha com a equação $I_{org} = \sum alt (a \times w)$, onde I_{org} é o índice de lesão do órgão, $\sum alt$ é a soma das alterações, a é o valor da pontuação e w é o fator de importância. As pontuações (a) das alterações foram classificadas como i) sem ocorrência = 0, ii) ocorrência leve = 1, iii) ocorrência moderada = 2 ou iv) ocorrência grave = 3. A importância dos fatores (w) foram classificados como: i) dano reversível (fragmentos celulares liberados no lúmen intestinal e/ou secreção apócrina) = 1, ii) dano geralmente reversível (vacuolização citoplasmática) = 2 e iii) dano irreversível (picnose nuclear e/ou células regenerativas danificadas) = 3.

3.5. Histoquímica

Cortes histológicos não corados do intestino médio de operárias de *P. helleri* obtidos conforme descrito acima, foram selecionados aleatoriamente e submetidos aos testes

histoquímicos de mercúrio bromofenol e ácido periódico-Schiff, para detecção de proteínas e carboidratos, respectivamente e analisados e fotografados usando um microscópio óptico Olympus BX 60.

3.5.1. Azul de bromofenol de mercúrio

As amostras não coradas 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, lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas e analisadas.

3.5.2. Ácido periódico de Schiff

As amostras não coradas foram incubadas em ácido periódico 0,4% por 30 min, lavadas em água destilada e transferidas para reativo de Schiff (Lillie, 1965) durante 1 h no escuro, lavadas em água corrente por 30 min, montadas e analisadas

3.5.3. Quantificação de proteínas e polissacarídeos no intestino médio

A quantificação de proteínas e carboidratos foi realizada por meio dos testes histoquímicos de azul de bromofenol de mercúrio e PAS, respectivamente. A quantificação foi realizada utilizando o programa de computador Image J. As imagens foram obtidas em microscópio de luz Olympus BX-60, utilizando lente objetiva de 40X e abertura numérica de 0,75 com os mesmos parâmetros de iluminação. As intensidades de reação positiva ao mercúrio bromofenol e PAS foram medidas analisando a intensidade dos valores de cinza nas imagens após conversão de cores RGB para escala de cinza (Solomon, 2009). Áreas de 32x32 pixels foram usadas para medir a intensidade de pixels nas imagens em 10 cortes aleatórios de cada intestino médio dos grupos controle e tratado (Oliveira et al., 2024), totalizando 200 seções histológicas.

3.6. Imunofluorescência

Amostras de intestino médio de operárias de *P. helleri* do grupo controle (n = 20) e

alimentadas com a concentração de tiametoxam encontrada em grão de pólen (n = 20) por 7 dias foram dissecadas em solução fisiológica para insetos para identificar apoptose e autofagia (10 intestinos para cada imunomarcação). As amostras foram transferidas para a solução fixadora de Zamboni por 30 min e lavadas cinco vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS) com Triton-X 100 a 1% (PBST). Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS) contendo Triton X-100 a 1% (PBST) por 30 min cada. Então, as amostras foram incubadas separadamente (cinco intestino médio para cada anticorpo) por 24 horas a 4°C, em solução de anticorpo anti-LC3/AB (#3868T; 1:500) para detecção de autofagia e anti-caspase-3 clivada (Asp175, #9664; 1:500) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA) para detecção de apoptose. Após lavagem em PBS, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) diluído 1:500 em PBS, por 24 h, a 4°C no escuro. Após lavagem em PBS, as amostras foram transferidas para 2 µg/mL de 4,6-diamidina-2-fenilindol (DAPI; Polysciences, Inc., Hayward, CA, EUA) para coloração dos núcleos por 30 min, lavadas com PBS e montados *in toto* em lâminas com solução de sacarose a 30%. As amostras foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, EUA).

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Operárias de *P. helleri*, do grupo controle (n = 10) e alimentadas com a concentração de tiametoxam encontrada em grão de pólen (n = 10) por 7 dias foram dissecadas e tiveram o intestino médio transferidos para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e sacarose 2% por 24 h. Após a lavagem com tampão cacodilato de sódio, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2h. Em seguida, as amostras passaram por mais uma lavagem em tampão cacodilato de sódio e foram desidratadas em série graduada de etanol (70%, 80%, 90% e 95%). Por fim, as amostras

foram embebidas em resina LR-White e os cortes ultra finos que foram corados com acetato de uranila aquoso a 2% por 10 min e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 25 min, examinados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

3.8. Estresse oxidativo

Para análises de estresse oxidativo, abdomens de operárias de *P. helleri* do grupo controle (n = 20) e alimentadas com tiametoxam por 7 dias (n = 20) foram dissecados e homogeneizados em com o auxílio de um homogeneizador Tissue Master 125 (Omni International, Kennesaw, EUA). As amostras foram centrifugadas a $15.000 \times g$ por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante foi usado para os testes subsequentes. A concentração de proteína foi determinada a partir do método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. O estresse oxidativo foi analisado a partir da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), da capacidade antioxidante total (TAC) e da quantidade de proteínas carboniladas (CP).

A atividade da SOD foi realizada pela quantificação do radical ânion superóxido produzido pela autooxidação do pirogallol (Marklund e Marklund, 1974). A atividade de CAT foi determinada pelo método de reação de peróxido de hidrogênio não decomposto com molibdato de amônio (Hadwan e Abed, 2016). A atividade da GST foi medida por meio da produção de tioéster, utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato (Habig et al., 1974). A TAC foi medida pelo método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP; Benzie e Strain, 1996). A oxidação de proteínas foi analisada pela quantificação de carbonilas proteicas pelo método DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazina) (Levine et al., 1990). As absorbâncias para SOD, CAT, GST, TAC foram medidas em espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) nos comprimentos de onda 320, 374, 340 e 593 nm, respectivamente. Os resultados de SOD, CAT e GST foram

expressos em unidades por miligrama de proteína (U/mg). Para a TAC foi utilizada a quantidade μM de Fe^{2+} . A carbonilação protéica foi expressa em nmol/mg de proteína.

3.9. Comportamento

Após exposição oral por 7 dias, 12 abelhas do grupo controle e 12 tratadas com tiametoxam, foram transferidas para arenas (placa de Petri 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura) com plástico transparente PVC perfurados para ventilação e aclimatadas por 15 min. Para cada uma das 3 colônias foram utilizadas 4 abelhas do controle e 4 expostas ao inseticida, sendo filmadas 4 abelhas por arena por 10 min utilizando câmera de vídeo digital em sala com luz artificial a 25 ± 3 °C e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa (Farder-Gomes et al., 2024). Os vídeos foram analisados utilizando o software Ethoflow® para calcular a distância percorrida (cm) e velocidade média de caminamento (cm/s) (Bernardes et al., 2021). O software Ethoflow® permite a avaliação de diferentes indivíduos na mesma arena, mantendo a identidade individual (Bernardes et al., 2021).

3.10. Estatística

O efeito da concentração de tiametoxam na sobrevivência das abelhas foi analisado usando o estimador Kaplan-Meier. A similaridade geral entre as curvas de sobrevivência foi avaliada pelo teste Qui-quadrado log-rank. Após verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, as médias do índice de lesão no intestino médio foram comparadas pelo teste U Mann-Whitney. Os dados de altura da borda estriada, intensidade dos valores de pixels dos testes histoquímicos e estresse oxidativo, foram submetidos ao teste *t* de Student. As quantidades de células em autofagia e apoptose foram analisadas por um modelo linear generalizado (GLM) ajustado com distribuição de erro de Poisson; distribuição adequada para dados de contagem (Crawley, 2012). Para os dados comportamentais (distância percorrida e velocidade média) foi ajustado um Modelo linear misto (LMM). Como as abelhas da mesma colônia foram monitoradas

juntas na mesma arena, a colônia foi considerada efeito aleatório. Os resíduos foram verificados em todos os modelos para verificar a adequação das distribuições. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, versão 4.3.2, 2023) com 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Sobrevivência

A concentração de tiametoxam encontrada em grãos de pólen após exposição oral crônica por 7 dias causou redução na sobrevivência de operárias de *P. helleri* de 97% no controle para 56% no tratamento (log-Rank: $\chi^2 = 13.2$, $df = 1$, $p < 0.001$; Fig. 1).

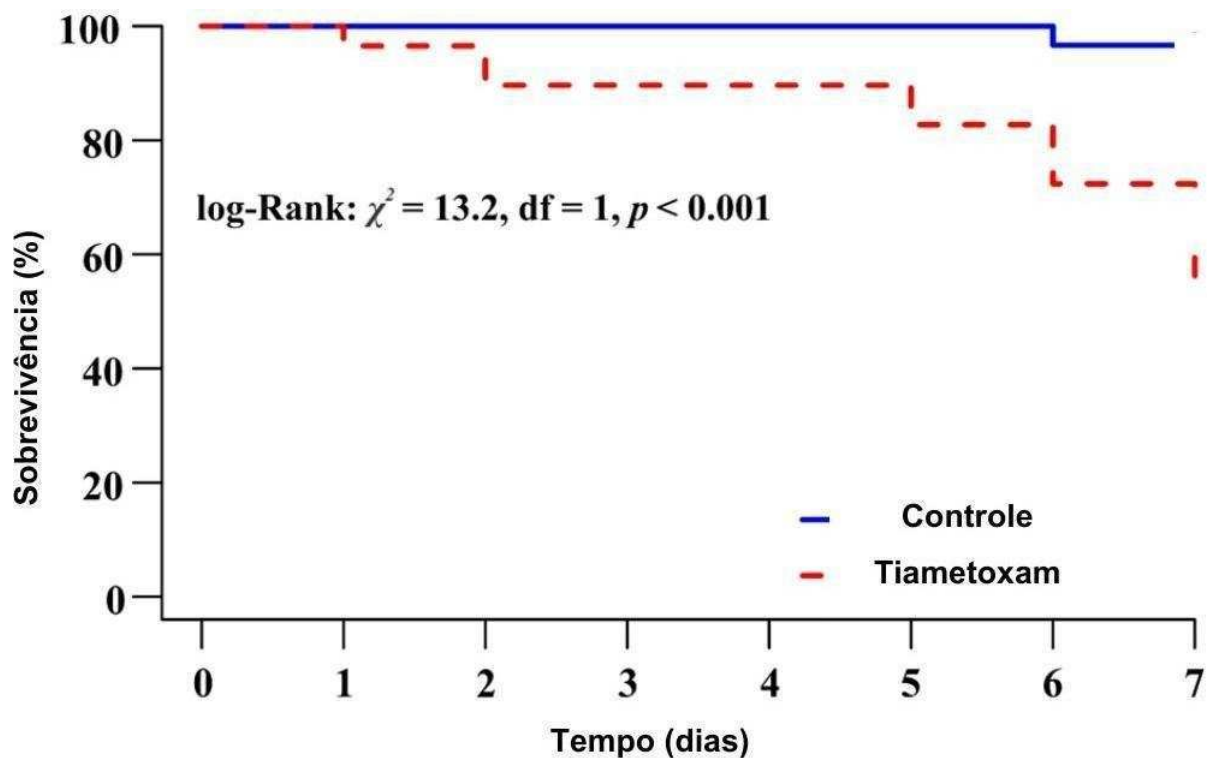


Figura 1. Curvas de sobrevivência de operárias de *Partamona helleri* do grupo controle e expostas à concentração encontrada em grão de pólen de tiametoxam (0,06 ng/g) por 7 dias submetidas a análise de sobrevivência usando estimador Kaplan-Meier (teste log-rank, $p < 0,05$).

4.2. Histopatologia

O intestino médio das operárias de *P. helleri* do grupo controle apresentou epitélio coeso com células digestivas colunares e borda estriada bem definida, núcleos com cromatina predominantemente descondensada, células regenerativas organizadas em ninhos na região basal e matriz peritrófica evidente no lúmen (Fig. 2A). Em contrapartida, o intestino médio das operárias tratadas com tiametoxam apresentou desorganização epitelial, caracterizada por protruções apicais, intensa vacuolização citoplasmática e liberação de fragmentos celulares no lúmen intestinal (Fig. 2B).

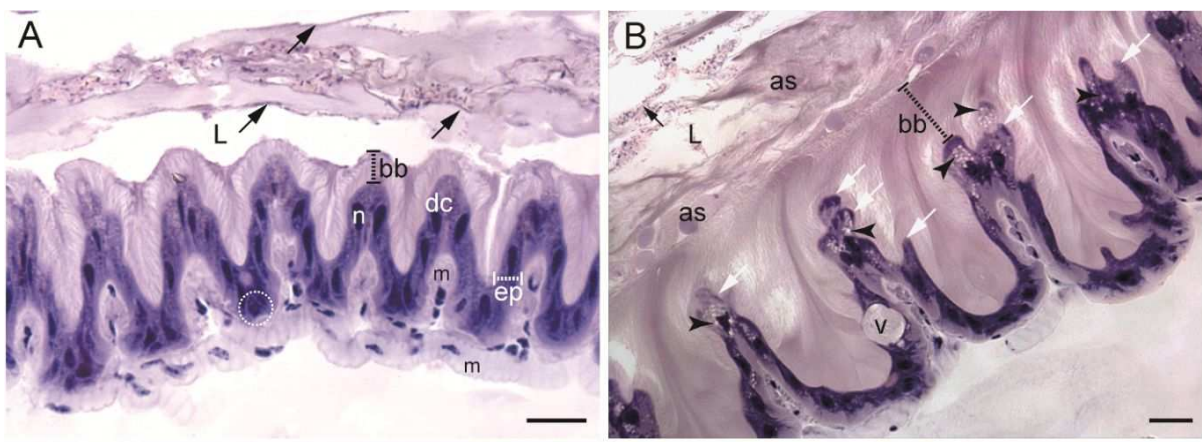


Figura 2. Micrografia de luz do intestino médio de operárias de *Partamona helleri*. **A)** Abelha controle mostrando epitélio (ep) coeso com células digestivas colunares (dc) com borda estriada (bb) apical, núcleo bem definido (n), ninhos de células regenerativas (círculo branco pontilhado), matriz peritrófica (seta preta) no lúmen (L) e músculos (m). **B)** Abelha tratada com tiametoxam apresentando epitélio com protruções apicais (seta branca), vacuolização citoplasmática (v), protusões citoplasmáticas (cabeça de seta) e secreções apócrinas (as) no lúmen (L). Barra de escala: 20 µm

As abelhas expostas ao tiametoxam apresentaram menor altura da borda estriada ($t = 7.632$, $df = 18$, $p < 0,0001$; Fig. 3A) e maior índice de lesão ($U = 2471$, $p < 0,0001$; Fig. 3B) que aquelas do grupo controle.

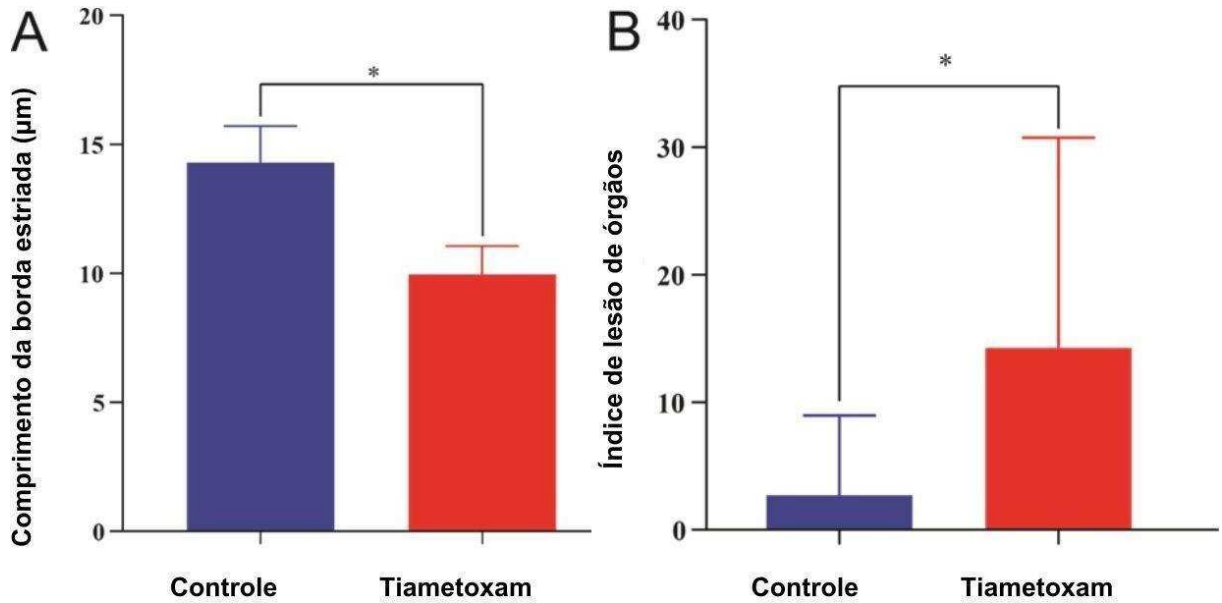


Figura 3. Morfometria do intestino médio de operárias de *Partamona helleri* expostas oralmente por 7 dias ao tiametoxam. **A)** Altura da borda estriada. **B)** Índice de lesão do órgão. *indicam diferença significativa pelos testes U Mann-Whitney (A) e t-Student (B) ($p < 0.05$).

4.3. Histoquímica

As análises semi-quantitativas obtidas pela intensidade de pixels das reações histoquímicas revelaram menor reação positiva para proteínas nas abelhas expostas ao tiametoxam em relação ao controle na região da matriz peritrófica ($t = 3.059$, $df = 18$, $p = 0,006$) e no epitélio ($t = 7.546$, $df = 18$, $p < 0,0001$) (Fig. 5A). Similarmente, o teste de PAS evidenciou menor reação positiva no tratamento com tiametoxam que no controle na matriz peritrófica ($t = 5.760$, $df = 18$, $p < 0,0001$) e no epitélio ($t = 19.948$, $df = 18$, $p < 0,0001$) (Fig.5B).

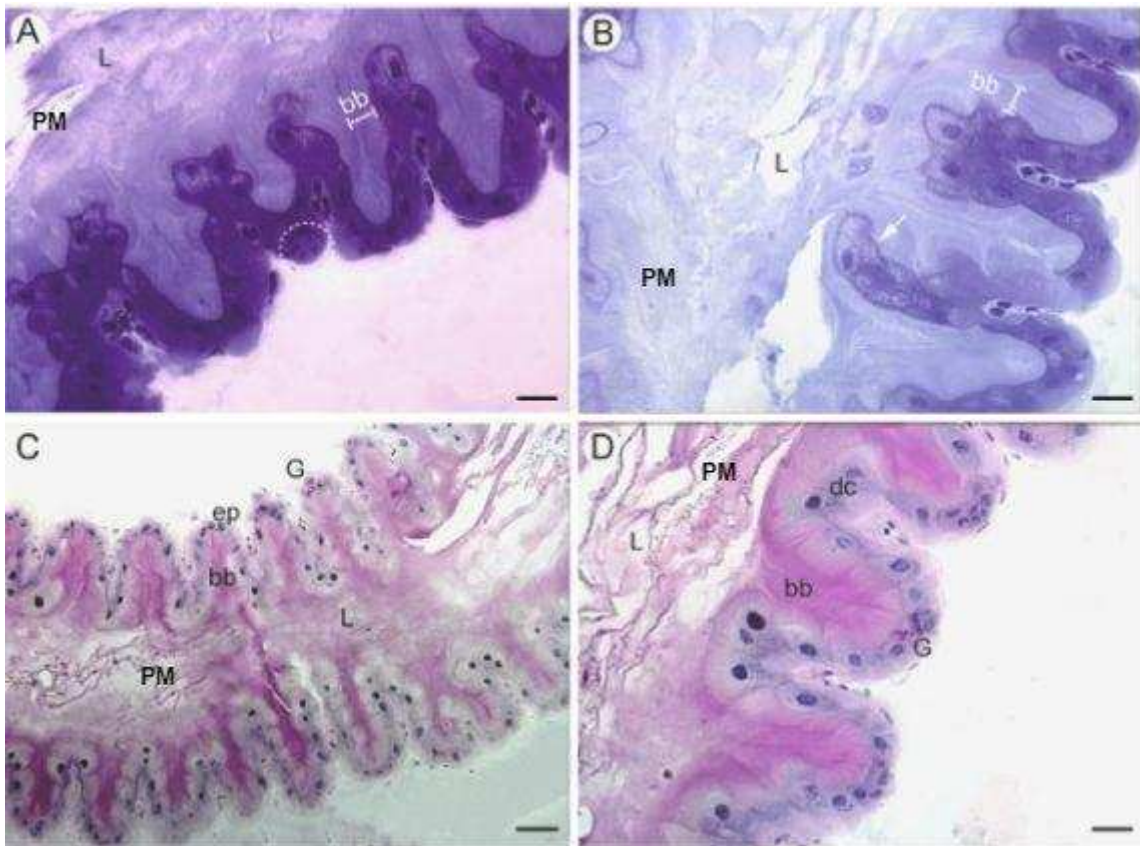


Figura 4. Micrografias de luz do intestino médio de operárias de *Partamona helleri* submetidas a testes histoquímicos. **A, B)** Teste de mercúrio bromofenol, borda estriada (bb) e células regenerativas (círculo) fortemente reativas para proteínas no controle (A) e fracamente nas abelhas tratadas com tiametoxam (B), que também apresentam protrusões apicais (seta). **C, D)** Teste de PAS com epitélio com células digestivas (dc), (ep) fracamente reativo para glicoconjugados (G) e com borda estriada (bb) fortemente reativa no controle (C) e tratamento com tiametoxam (D). L = lúmen. PM = Matriz peritrófica. Barra de escala: 20 μm (A, B, D); 50 μm (C).

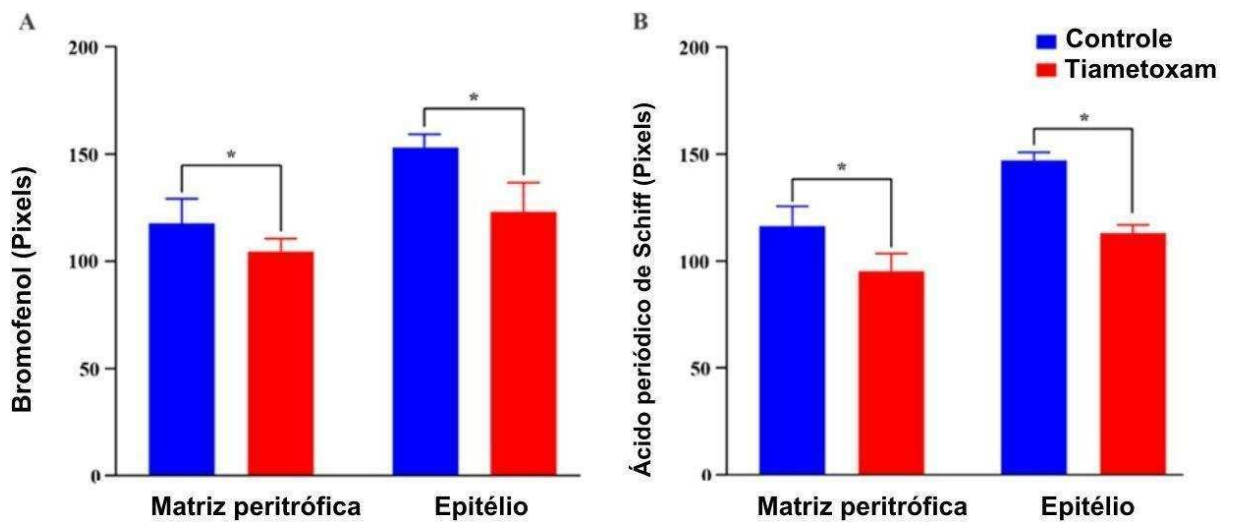


Figura 5. Intensidade de pixels das reações positivas para proteínas (A) e carboidratos (B) no epitélio e na matriz peritrófica do intestino médio de operárias de *Partamona helleri* tratadas com tiametoxam. * indicam diferença pelo teste t-Student ($p < 0.05$).

4.4. Imunofluorescência

A imunofluorescência revelou um aumento de células em autofagia (4.14 ± 1.34 células, $\chi^2 = 8.39$, $df = 12$, $p = 0.0037$) (Fig. 6A, B, E) e apoptose (9.71 ± 1.97 células, $\chi^2 = 34.64$, $df = 12$, $p < 0.001$) (Fig. 6C, D, E) no epitélio do intestino médio de operárias de *P. helleri* após exposição por 7 dias a concentração de tiametoxam encontrada em grão de pólen.

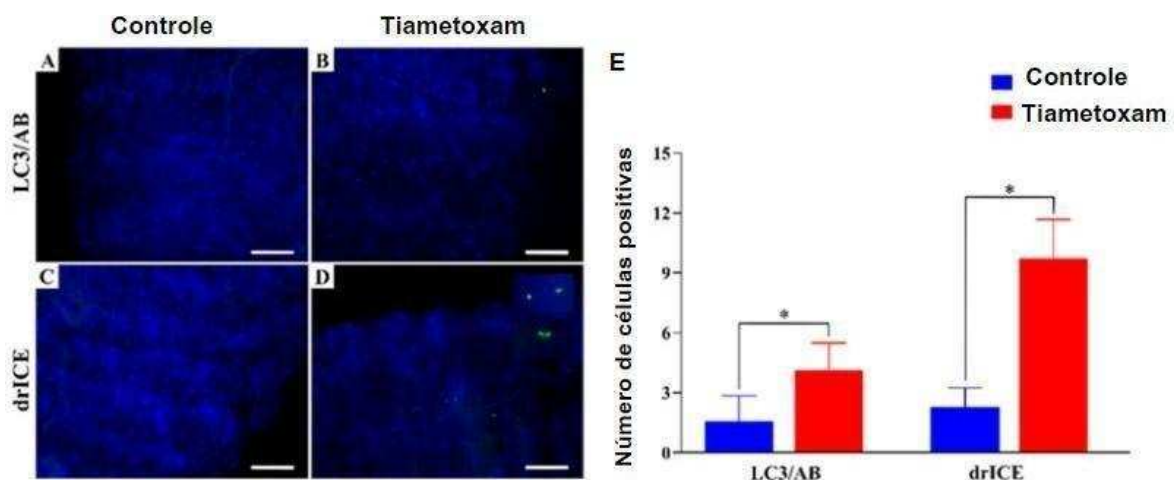


Figura 6. Imunofluorescência do intestino médio de operárias de *Partamona helleri* do grupo controle (A, C) e expostas ao tiametoxam por 7 dias (B, D) para autofagia (LC3 A/B) e apoptose

(drICE). **E)** Quantidade de células em autofagia (LC3 A/B) e apoptose (drICE). * indicam diferença pelo modelo linear generalizado ($p < 0.05$).

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão

O intestino médio de operárias de *P. helleri* do grupo controle apresentou células digestivas com superfície apical contendo microvilosidades bem desenvolvidas e citoplasma com retículo endoplasmático rugoso e numerosas mitocôndrias (Fig. 7A) A região basal apresentou invaginações da membrana plasmática formando labirinto bem desenvolvido associado à mitocôndrias e núcleo mediano apresentou cromatina predominantemente descondensada e nucléolo evidente (Fig. 7B).

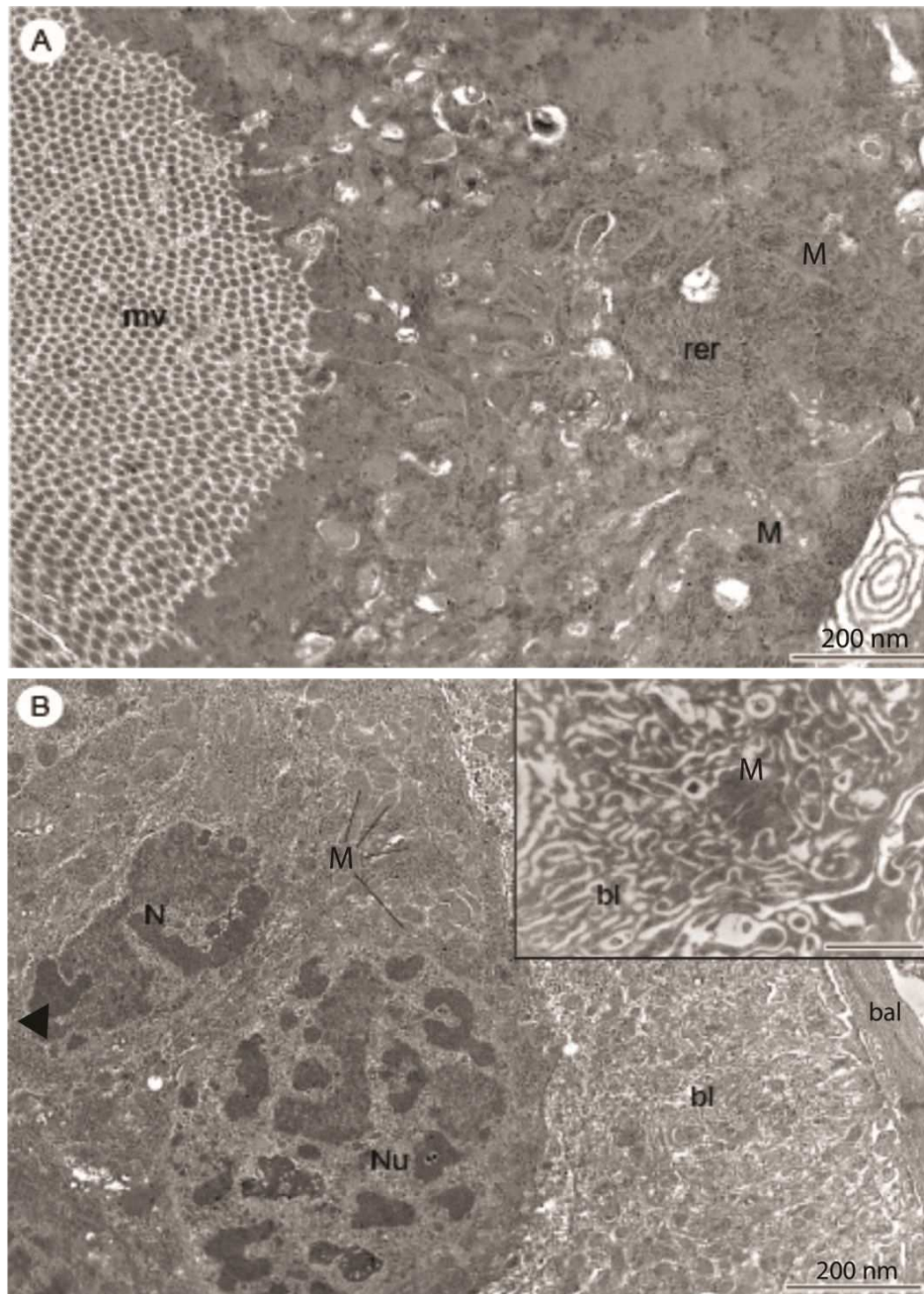


Figura 7. Micrografia eletrônica de transmissão das células digestivas do intestino médio de operárias de *Partamona helleri* do grupo controle. **A)** Região apical mostrando superfície com microvilosidades (mv) e citoplasma com retículo endoplasmático rugoso (rer) e mitocôndrias (M). **B):** Região mediana com núcleo (N) rico em cromatina descondensada com grumos de cromatina condensadas (pontas de seta) e nucléolo (Nu). Note região basal com invaginações da membrana plasmática formando o labirinto basal (bl) bem desenvolvido, mitocôndrias (m) e lâmina basal (bal). [Insert]: Detalhe em maior aumento mostrando o labirinto basal organizado e presença de mitocôndrias. Barra de escala: 200 μ m.

O intestino médio de *P. helleri* alimentadas oralmente com tiametoxam apresentou células digestivas com superfície apical contendo algumas protrusões que foram liberadas como fragmentos para o lúmen e secreção apócrina (Fig. 8A). A região mediana da célula apresentou núcleo com cromatina descondensada e citoplasma com esferocristais e retículo endoplasmático organizado em vesículas (Fig. 8B). A região basal apresentou o labirinto dilatado e mitocôndrias sem cristas bem definidas (Fig.9A). Além disso, algumas células apresentavam muitos vacúolos autofágicos (Fig. (9B).

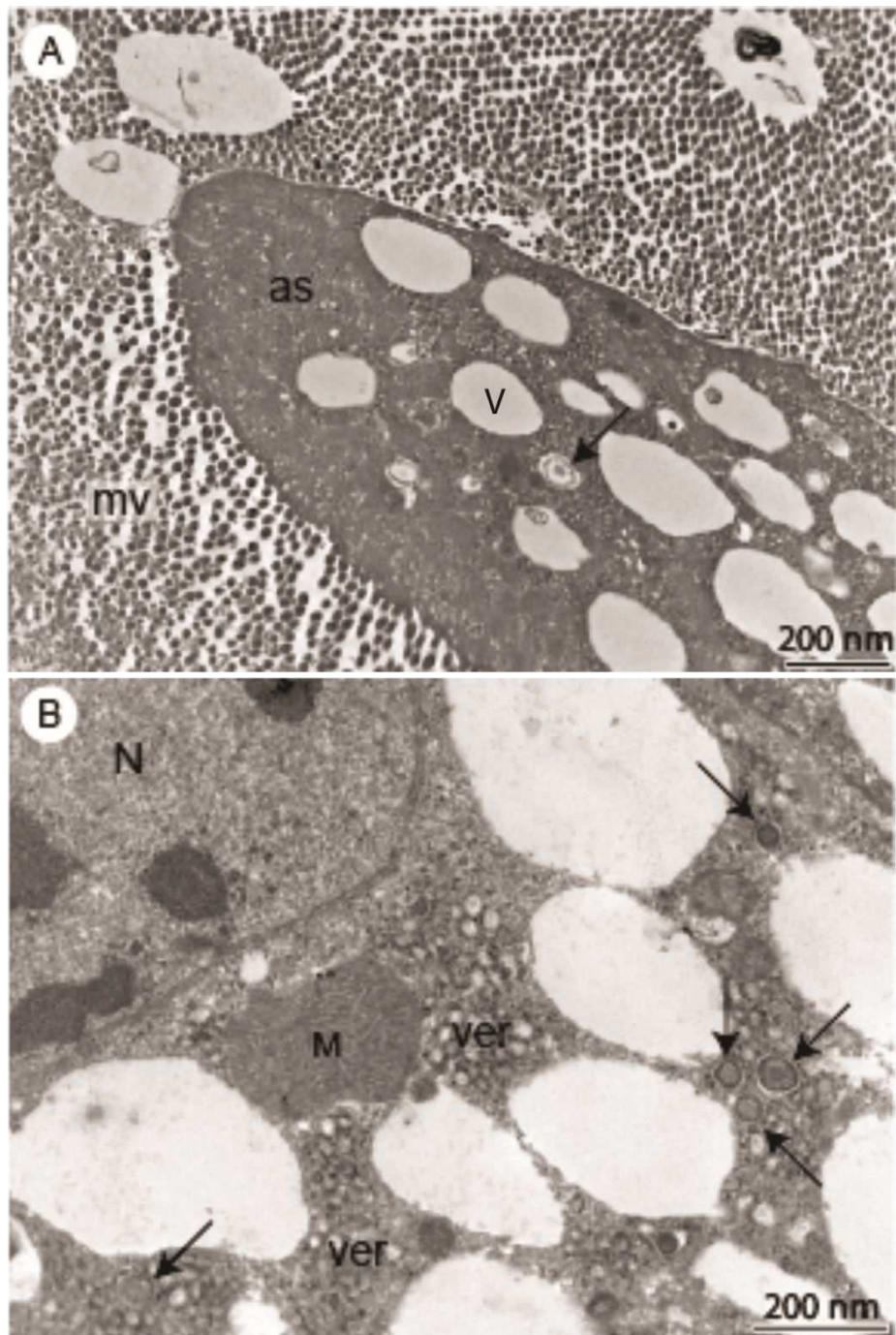


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do intestino médio de operárias adultas de *Partamona helleri* alimentadas oralmente com concentração de tiametoxam encontrada em grão de pólen por 7 dias. **(A):** Ápice celular com fragmento liberado por secreção apócrina (as), microvilosidades (mv), vacúolos (v) e esferocristais (seta). **(B):** Região medial na com núcleo (N), esferocristais (setas), retículo endoplasmático vesicular (ver) e mitocôndrias (m).

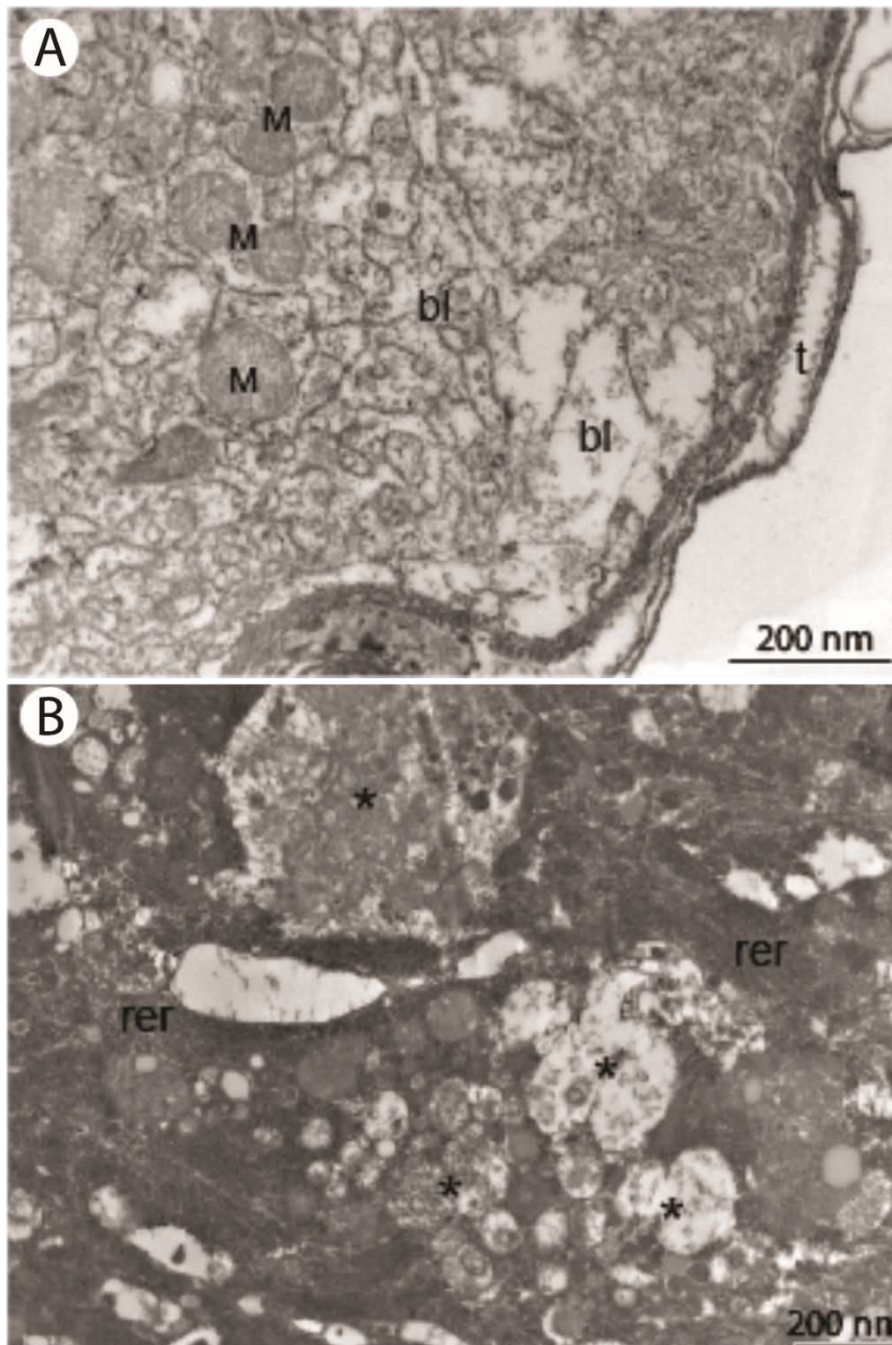


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de células digestivas de operárias adultas de *Partamona helleri* alimentadas oralmente com tiametoxam por 7 dias. **(A):** Região basal com labirinto basal (bl) dilatado e mitocôndrias danificadas sem cristas mitocondriais aparentes (m). **(B):** Citoplasma rico em vacúolos autofágicos (asteriscos) e retículo endoplasmático rugoso (rer). traquéia.

4.6. Estresse Oxidativo

A atividade enzimática no abdômen de operárias de *P. helleri* expostas ao tiametoxam, apresentou aumento da superóxido dismutase ($t = 3.646$, $df = 8$; $p = 0.006$; Fig.10A) e glutationa S-transferase ($t = 2.661$, $df = 8$, $p = 0.028$); Fig. 10B), enquanto não houve alterações significativas da catalase ($t = 1.208$, $df = 8$, $p = 0.261$; Fig. 10C) e da capacidade antioxidante total ($t = 0.347$, $df = 8$, $p = 0.737$; Fig. 10D). A quantidade de proteínas carboniladas aumentou após exposição ao tiametoxam ($t = 3.033$, $df = 8$; $p = 0.016$; Fig. 10E).

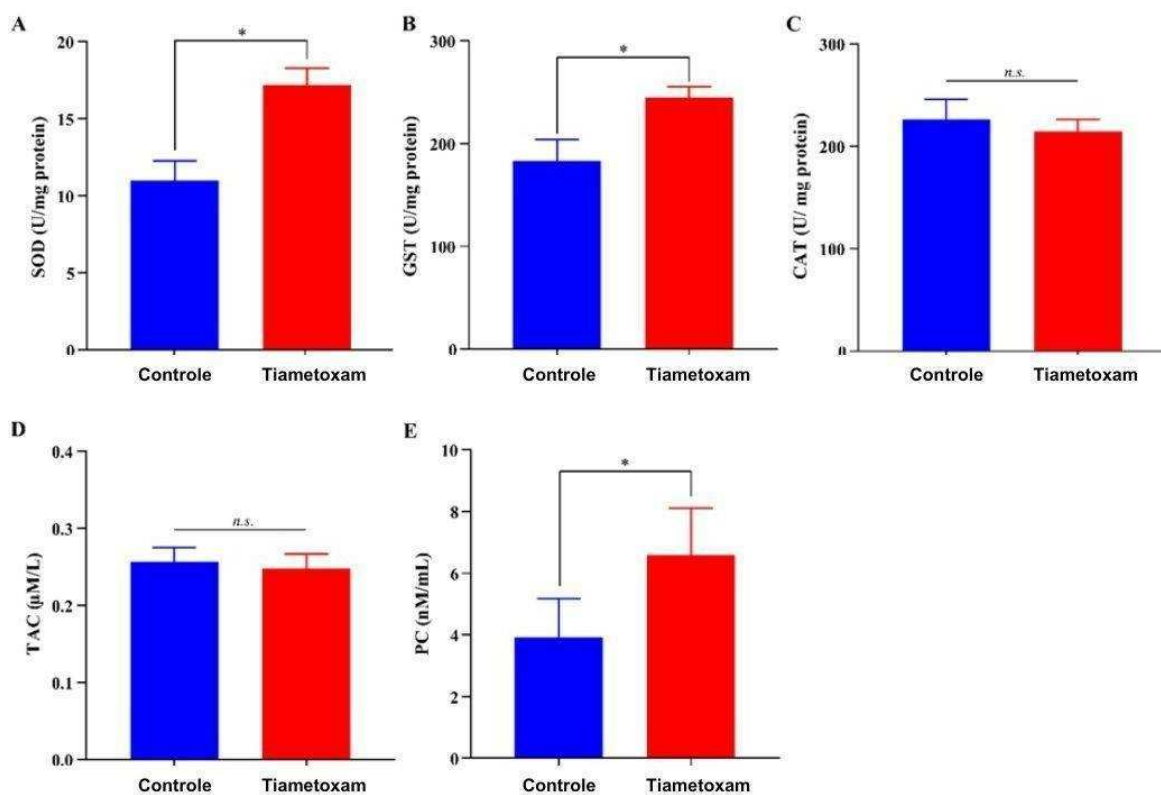


Figura 10. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), glutationa S-transferase (GST) (B), catalase (CAT) (C), capacidade antioxidante total (TAC) (D) e proteínas carboniladas (PC) (E) em operárias adultas de *Partamona helleri* do grupo controle e expostas à concentração encontrada em grão de pólen de tiametoxam. * indicam diferença e ns sem diferença pelo teste t-Student ($p < 0.05$).

4.7. Comportamento

Operárias de *P. helleri* expostas por 7 dias à concentração de tiametoxam encontrada em grãos de pólen apresentaram mudanças no comportamento de locomoção em comparação ao controle (Fig. 11A-B), com diminuição na distância média percorrida ($\chi^2 = 4,22$, $df = 1$, $p = 0,03$; Fig. 11C) e da velocidade de caminhada ($\chi^2 = 5,74$, $df = 1$, $p = 0,01$; Fig. 11D).

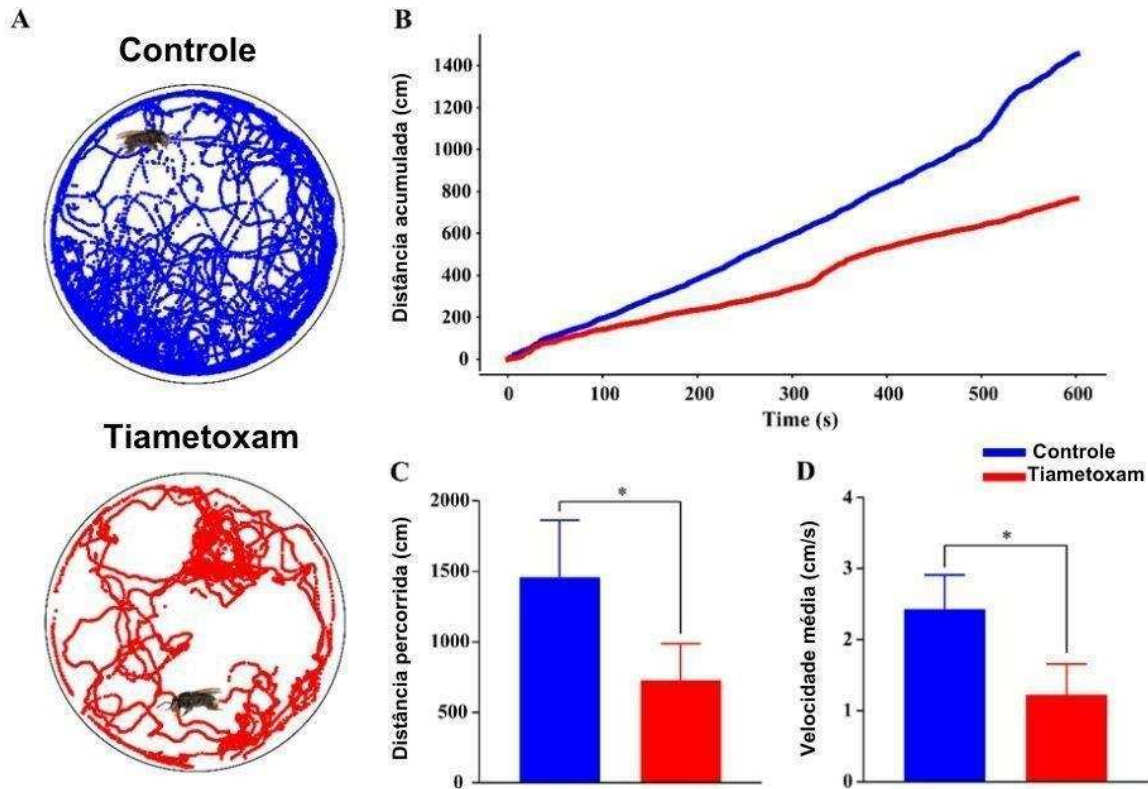


Figura 11. Comportamento de caminhada de *Partamona helleri* em exposição à concentração encontrada em grão de pólen de tiametoxam por 7 dias (A). Trilhas em 2D representativas de uma abelha monitorada em arena (9 cm x 9 cm) ao longo de 10 min para os grupos controle e tratado. (B). Distância acumulada (cm) exibida em cada quadro (30 quadros por segundo) durante 600 s de monitoramento das abelhas controle e tratado. (C) Distância percorrida. (D). Velocidade média. * indicam diferença pelo modelo linear misto ($p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

A contaminação de insetos não alvo por neonicotinóides tem causado preocupação à comunidade científica, crescendo o número de estudos demonstrando que esta classe de inseticida apresenta efeitos negativos sobre estes organismos (Morrissey et al., 2015, Tooker

& Pearsons, 2021, Batista et al., 2022), especialmente polinizadores (Sánchez-Bayo et al., 2016, Lu et al., 2020), culminando na proibição de alguns neonicotinóides em países da União Europeia (EFSA, 2015). O tiametoxam apresenta toxicidade para *A. mellifera* 192 vezes maior que outros neonicotinóides, como o acetamiprido e tiacloprido (Iwasa et al., 2004). A concentração de tiametoxam de 37,5 g de ingrediente ativo, recomendada para o controle de pragas em citros no Brasil, causa mortalidade de *A. mellifera* em menos de 4h após a exposição (Maienfisch et al., 2001; Oliveira et al., 2013), além de afetar as larvas da abelha, prejudicando o desenvolvimento, reduzindo o tamanho corporal e condensando células cerebrais (Tavares et al., 2015; Grillone et al., 2017). Nossos resultados mostram que a concentração de tiametoxam encontrada em grãos de pólen (0,06 ng/g) diminui a sobrevivência em operárias de *P. helleri* após 7 dias de exposição em mais de 40%.

As análises do intestino médio de operárias de *P. helleri* alimentadas durante 7 dias com dieta contaminada com tiametoxam revelam alterações significativas do índice de lesão de órgão em comparação ao grupo controle, devido à desorganização do epitélio intestinal e da borda estriada, aumento da secreção apócrina lúmen, condensação da cromatina nuclear e vacuolização do citoplasma. Danos semelhantes foram relatados no intestino médio de *A. mellifera* após a exposição aguda à concentrações letais dos inseticidas lambda cialotrina (Castro et al., 2020) e imidacloprido (Carneiro et al., 2022), fungicidas iprodiona (Carneiro et al., 2020) e azoxistrobina (Serra et al., 2023) e acaricidas espiromesifeno (Serra et al., 2021) e ciflumetofeno (Reis et al., 2024). Além disso, danos semelhantes também foram relatados em

P. helleri expostas a lambda cialotrina (Motta et al., 2023), fipronil (Farder-Gomes et al., 2021) e espinosade (Araújo et al., 2019). Esses resultados demonstram que, mesmo em concentrações campo realista, tiametoxam compromete a absorção de nutrientes no intestino médio de *P. helleri* e, por consequência, a homeostase do organismo.

O aumento da liberação de secreção apócrina nas operárias de *P. helleri* expostas ao tiametoxam em relação às abelhas do grupo controle pode ser uma resposta de desintoxicação ao inseticida pelas células digestivas, como observado em *Podisus nigrispinus* após exposição ao piretróide permetrina (dos Santos-Junior et al., 2019) e em *A. mellifera* após exposição ao acaricida ciflumetofeno (Reis et al., 2024). Proteínas da superfamília citocromo p450 podem auxiliar no processo de desintoxicação, uma vez que, elas metabolizam xenobióticos tornando-os hidrossolúveis, facilitando o processo de excreção (Feyereisen, 1999; Li et al., 2007). A secreção apócrina também pode conter componentes da matriz peritrófica (Marques-Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2015), na tentativa de aumentar a proteção contra o tiametoxam. Assim, o aumento de secreção apócrina no epitélio das operárias de *P. helleri* pode ser uma resposta metabólica para mitigar os efeitos crônicos do tiametoxam.

O epitélio do intestino médio das abelhas expostas ao tiametoxam apresentaram menor altura da borda estriada em relação ao grupo controle, além de rupturas ao longo da estrutura, o que pode afetar a digestibilidade, visto que há uma diminuição na área de superfície celular disponível para secreção, absorção de nutrientes e transporte de íons (Agrawal et al., 2014; Desneux et al., 2007).

Nas abelhas expostas ao tiametoxam ocorre uma dilatação e desorganização do labirinto basal das células digestivas em relação ao grupo controle, além da presença de mitocôndrias com cristas dilatadas e irregulares, similar ao encontrado em *A. mellifera* expostas agudamente imidacloprido (Carneiro et al., 2022), lambda-cialotrina (Castro et al., 2020) e ciflumetofeno (Reis et al., 2024). A dilatação do labirinto basal, que corresponde ao espaço extracelular, pode ser resposta para desintoxicação do órgão, através do alto transporte de substâncias entre o citosol e a hemolinfa. Já os danos mitocondriais, podem ocasionar em

perda do potencial de membrana e liberação de componentes que induzem apoptose pela via das caspases, comprometendo a célula (Farder-Gomes et al., 2021, Carneiro et al., 2022).

As células digestivas das operárias expostas ao tiametoxam apresentam o retículo endoplasmático rugoso vesicular, possivelmente indicando um estresse de retículo como reportado para células humanas com exposição a metais pesados (Komoike et al., 2012 ; Luo et al., 2016), que pode desencadear aumento nos níveis de estresse oxidativo, autofagia e morte celular (Li et al., 2015; Zhang et al., 2019). As células digestivas também apresentam abundância de esferocristais após a exposição ao inseticida, similar ao reportado nestas células de *A. mellifera* exposta ao inseticida teflubenzuron (Oliveira et al., 2024). Esferocristais apresentam concreções lamelares concêntricas de peptidoglicano concentrando íons (Cruz-Landim e Serrão, 1997; Lipovšek et al., 2002), indicando uma possível resposta das células digestivas de *P. helleri* à intoxicação pelo tiametoxam.

A reação para mercúrio bromofenol indica baixa reação para proteínas no epitélio intestinal e na matriz peritrófica das operárias de *P. helleri* expostas ao tiametoxam em relação ao grupo controle. Devido suas funções de digestão do alimento e absorção de nutrientes (Serrão & Cruz-Landim et al. 1996), o intestino médio possui células digestivas com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e alta atividade secretora, responsável pela produção das enzimas digestivas (Schumaker et al., 1993; Da Lage et al., 2018). Além disso, essas células também secretam proteínas da matriz peritrófica, responsável por auxiliar na digestão, proteger de choques mecânicos e atuar na defesa contra patógenos (Marques-Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2015). Assim como o mercúrio bromofenol, o teste de PAS indicou baixa reação ao longo do epitélio intestinal e da matriz peritrófica das operárias de *P. helleri* do grupo controle, evidenciando baixa quantidade de polissacarídeos neutros e conjugados nesta região. A superfície apical das células digestivas possui microvilosidades que aumentam a superfície de contato com o alimento, facilitando a absorção de nutrientes

(Serrão & Cruz-Landim, 1996) onde estão presentes o glicocálix, formado por glicoproteínas e glicolipídios (Terra et al., 2019). Suas principais funções são proteção de choques físicos, reconhecimento e adesão celular (Terra et al., 2019). Já a matriz peritrófica, é rica em proteoglicanos, glicosaminoglicanos e fibrilas de quitina (Hegedus et al., 2009; Liu et al., 2019). Nossos achados vão de encontro aos resultados obtidos na histopatologia, indicando que o glicocálix não foi uma barreira efetiva contra o tiametoxam, o qual afetou proteínas e polissacarídeos do epitélio intestinal e da matriz peritrófica comprometendo os processos de absorção de nutrientes, secreção de enzimas e proteção contra xenobióticos tornando o inseto mais suscetível a infecções.

O aumento no número de células em apoptose e autofagia, nas células do intestino médio das abelhas expostas ao tiametoxam indicam possível remoção de células danificadas (Fuchs & Steller, 2011).

Na apoptose pela via das caspases, ocorre desorganização das lâminas nucleares que sustentam o envoltório nuclear e despolimerização dos microtúbulos citoplasmáticos, (Ndozangue-Touriguine et al., 2008) culminando na fragmentação do Golgi e retículo endoplasmático, aumentando a vacuolização citoplasmática (Aki et al., 2012), que foi encontrada no epitélio intestinal das abelhas tratadas. Além disso, outras características comuns ao processo de apoptose foram observadas na microscopia eletrônica de transmissão, como aumento dos espaços intercelulares, protrusões apicais e desorganização das microvilosidades (Taatjes et al., Carneiro et al., 2022), afetando a capacidade de absorção de nutrientes e desestruturando o epitélio intestinal (Farder-Gomes et al., 2021., Carneiro et al., 2022).

As células positivas para LC3/AB, indicam a ocorrência de autofagia, pois essa proteína é associada à membrana dos autofagossomos (Tanida et al. 2004), que foram evidenciados pela presença de dos vacúolos autofágicos, o que pode indicar um mecanismo

de proteção celular envolvendo a degradação de tiametoxam, uma vez que a autofagia possui função citoprotetora (Tanida et al. 2004). Resultados semelhantes foram relatados no epitélio intestinal de *P. helleri* expostas ao espinosade (Araújo et al. 2019). A autofagia pode mitigar o estresse oxidativo e atuar na remoção de proteínas mal dobradas e organelas danificadas (Salcher et al., 2017). Todavia, apesar de desempenhar papel crucial na homeostase celular, a autofagia, em níveis elevados, pode ocasionar morte celular no intestino médio de insetos expostos a pesticidas (Catae et al., 2014, Fiaz et al., 2018, Araújo et al., 2019, Reis et al., 2024). Desse modo, é plausível sugerir que o processo de autofagia induzido pelo tiametoxam apresenta potencial para dano ao intestino médio de *P. helleri*.

O tiametoxam induz um aumento na atividade da superóxido dismutase no abdômen de operárias de *P. helleri*, similar ao relatado para os inseticidas fipronil (Farder-Gomes et al. 2021) e lambda-cialotrina (Motta et al. 2023) para esta abelha, sugerindo uma primeira defesa aos superóxidos formados após exposição ao tiametoxam, uma vez que essa enzima catalisa a dismutação de ânions superóxido em água e peróxido de hidrogênio, que é então dissociado em água e oxigênio pela catalase (Badgular et al., 2015). Entretanto, a atividade de catalase não apresentou diferença significativa em relação às abelhas do grupo controle, sugerindo que os níveis encontrados dessa enzima já são suficientes para neutralizar o excesso de superóxidos derivados da ação da superóxido dismutase. Além disso, o aumento observado da atividade da glutathione S-transferase (GST) nas abelhas expostas ao inseticida, pode compensar a atividade de catalase, como reportado para outros pesticidas (Bagnyukova et al., 2005; Farder-Gomes et al., 2021), já que GST atua na desintoxicação através da catálise da conjugação de metabólitos prejudiciais com a glutathione, produzindo menos compostos tóxicos para serem eliminados da célula (Jameel et al., 2019; Motta et al., 2023). Estes resultados sugerem que em *P. helleri*, GST desempenha papel fundamental na proteção das espécies reativas de oxigênio induzidas pelo tiametoxam.

A capacidade antioxidante total não foi afetada nas abelhas expostas ao tiametoxam, uma vez que este marcador leva em conta todas as moléculas intracelulares com poder antioxidante, principalmente oriundas da alimentação, a qual não variou entre controle e tratamento. Entretanto, as operárias de *P. helleri* tratadas com tiametoxam apresentam aumento na quantidade de proteínas carboniladas, indicando danos em proteínas por oxidação (Clasen et al., 2012; Sule et al., 2022). A carbonilação de proteínas é um processo oxidativo irreversível, sendo frequentemente utilizado como biomarcador de estresse oxidativo pela exposição a inseticidas (Fedorova et al., 2014; Farder-Gomes et al., 2024).

Sabe-se que o pesticidas induzem a produção de quantidades excessivas de radicais livres, como ânions superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO) e radicais hidroxila (-OH) nos insetos através do desacoplamento mitocondrial, o que leva ao aumento de consumo de O_2 e aumento drástico de O_2^- danificando lipídios, DNA e proteínas (Vidau et al., 2011; Wang et al., 2016; Chakrabarti et al. 2020). Além disso, o estresse oxidativo pode ativar vias de morte celular, como apoptose e autofagia (Farder-Gomes et al., 2021; Sule et al., 2022; Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021), o que foi observado neste estudo, sugerindo que o aumento de células em apoptose e autofagia no intestino médio de operárias de *P. helleri* expostas ao tiametoxam podem ter sido desencadeadas pelo estresse oxidativo gerado pela ingestão crônica do inseticida em doses residuais.

A redução da velocidade média e da distância percorrida pelas abelhas expostas ao tiametoxam, são semelhantes aos resultados observados após exposição a inseticidas inibidores de acetilcolinesterase (Bai et al. 2015; Morais et al. 2018), enzima que catalisa a degradação do neurotransmissor acetilcolina, mas, quando inibida, causa hiperexcitação (Thapa et al. 2017). Tiametoxam atua no sistema nervoso dos insetos, mais precisamente causando abertura dos canais iônicos nos receptores nicotínicos de acetilcolina, entretanto, sua molécula não é sensível a ação da acetilcolinesterase, portanto, é plausível sugerir que as

alterações na velocidade média e distância percorrida pelas abelhas tenha relação com a interferência do tiametoxam no sistema nervoso do inseto. Além disso, os danos no epitélio do intestino médio podem comprometer os processos de obtenção de energia afetando a disponibilidade de ATP, semelhante ao observado em operárias de *P. helleri* expostas ao fungicida fluazinam (Gomes et al., 2024). A baixa disponibilidade de ATP pode comprometer a obtenção de alimento diminuindo as taxas de visitação às flores (Bernauer et al., 2015; Boff et al., 2021), desse modo, é possível que, mesmo em baixas concentrações, o tiametoxam comprometa não só as abelhas expostas no campo, mas toda a colônia.

6. CONCLUSÃO

A mortalidade é um fator importante, todavia, os demais efeitos subletais, como os encontrados aqui em abelhas, permanecem negligenciados. Portanto, avaliar os efeitos subletais dos inseticidas em concentrações residuais encontradas em campo é um importante mecanismo para entender como eles afetam os organismos, visto que, em longo prazo, essas alterações comprometem a sobrevivência do inseto e induzem o seu declínio populacional. Os resultados indicam que o consumo alimentar por longos períodos da concentração do inseticida tiametoxam encontrada em grãos de pólen é danoso para operárias adultas de *P. helleri* comprometendo a digestão e causando morte celular no intestino médio, alterando a atividade de enzimas e marcadores antioxidantes induzindo estresse oxidativo e afetando a locomoção das abelhas com potencial para comprometer toda a colônia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, F.C., Domingues, C.E.D. Hepato-Nephrotic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. PLOS One 10: e0132349, 2015

- Agrawal, S., Kelkenberg, M., Begum, K., Steinfeld, L., Williams, C.E., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Parque, Y., Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H. Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 49: 24-34, 2014
- Almeida, C.H.S., Haddi, K., Toledo, P.F.S., Rezende, S.M., Santana, W.C., Guedes, R.N.C., Newland, P.L. et al. Sublethal agrochemical exposures can alter honey bees and Neotropical stingless bees' color preferences, respiration rates, and locomotory responses. *Science of The Total Environment* 779: 146432, 2021
- Alsafran, M., Rizwal, M., Usman, K., Saleem, M.H., Al Jabri, H. Neonicotinoid insecticides in the environment: A critical review of their distribution, transport, fate, and toxic effects. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10: 108485, 2022
- Alves dos Santos, I., Silva, C.I., Pinheiro, M., Kleinert, A.M.P. Quando um visitante floral é um polinizador? *Rodriguésia* 67 :295-307, 2016
- Alves, S.N., Serrão, J.E., Melo, A.L. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* 41: 592-597, 2010
- Araújo, R.S., Viana, T.A., Botina, L.L Bastos, D.S.S., Alves, B.C.S., Neves, M.M., Bernardes, R.C. et al. Investigating the effects of mesotrione/atrazine-based herbicide on honey bee foragers. *Science of the Total Environment* 898: 165526, 2023
- Araújo, R.S., Fernandes, K.M., Lopes, M.P., Martins, G.F., Tavares, M.G. Spinosad-mediated effects on survival, overall group activity and the midgut of workers of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175: 148-154, 2019.

- Araújo, R.S., Lopes, M.P., Viana, T.A., Bastos, D.S.S., Neves, M.M., Botina, L.L., Martins, G.F. Bioinsecticide spinosad poses multiple harmful effects on foragers of *Apis mellifera*. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 66923-66935, 2023
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-225, 2010
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology* 78: 325-331, 2006
- Bai, A.K., Reddy, C.C. Inhibition of acetylcholinesterase as a criterion to determine the degree of insecticide poisoning in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural Research* 16: 112-114, 1977
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123, 2006
- Batista, A., Domingues, C., Costa, M., Silva-Zacarin, E. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? *Journal of Apicultural Research* 59: 1-10, 2020
- Batista, N.R., Oliveira, V.E.S., Crispim, P.D., Nocelli, R.C.F., Junior, W.F.A. Is the social wasp *Polybia paulista* a silent victim of neonicotinoid contamination? *Environmental Pollution* 308: 119682, 2022
- Bayo, F.S., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N. Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International* 89-90: 7-11, 2016
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76, 1996
- Bernardes, R.C., Lima, M.A.P.A; Guedes, R.N.C; da Silva, C.B; Martins, G.F.
- Ethoflow:
computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis.

Sensors 21, 323737, 2021.

- Bernardes, R.C., Fernandes, K.M., Bastos, D.S.S., Penha, A.F., Aires, F., Lopes, M.P., Oliveira, L.L. et al. Impact of copper sulfate on survival, behavior, midgut morphology, and antioxidant activity of *Partamona helleri* (Apidae: Meliponini). *Environmental Science and Pollution Research* 29: 6294-6305, 2021
- Bernauer, O.M., Gaines-Day, H.R., Steffan, S.A. Colonies of Bumble Bees (*Bombus impatiens*) Produce Fewer Workers, Less Bee Biomass, and Have Smaller Mother Queens Following Fungicide Exposure. *Insects* 16: 478-488, 2015
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-holm, P., Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22: 25-34, 1999
- Boff, S., Scheiner, R., Raizer, J., Lupi, D. Survival rate and changes in foraging performances of solitary bees exposed to a novel Insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211: 111869, 2021
- Bolognesi, R., Terra, W., Ferreira, C. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology* 54: 1413-1422, 2008
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulso, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, S. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 35-67, 2015
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248- 254, 1976
- Breeze, T.D., Bailey, A.P., Balcombe, K.G., Potts, S.G. Pollination services in the UK: How important are honey bees? *Agriculture, Ecosystems, Environment* 142: 137-143, 2013
- Buege, J.A., Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302-

310, 1978

- Caccia, S., Casartelli, M., Tettamanti, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research* 377, 505-525, 2019
- Campbell, J.B., Nath, R., Gadau, J., Fox, T., DeGrandi-Hoffman, G., Harrison, J.F. The fungicide Pristine® inhibits in vitro mitochondrial function but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 86: 11-16, 2016
- Carneiro, L.S et al., Martinez, L.C., Oliveira, A.H., Cossolin, J.F.S., Resende, M.T.C.S., Gonçalves, W.G., Santana, L.M. Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of Total Environment* 815 (152847), 2022
- Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189: 109991, 2020
- Carvalho, C.A.L., Marchini, L.C., Ros, P.B. Pollen sources used by *Apis mellifera* and *Trigonini* (Apidae) species in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. *Entomology* 58: 49-56, 1999
- Castro, M.B.A, Martinez, L.C., Cossolin, J., Serra, R., Serrão, J.E. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248: 1-11, 2020
- Catae, A.F., Alves, T.C.R., Oliveira, R.A.D., Nocelli, R.C., Malaspina, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy Research and Technique* 77: 274-281, 2014
- Cavalcante, V.M., Cruz-Landim, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-40, 1999

- Chapman, R. F. (2013). The insects: structure and function. Vol. 5, Cambridge University Press, 929 p, 2013.
- Colin, T., Plath, J.A., Klein, S., Vine, P., Devaud, J.M., Lihoreau, M., Meikle, W.G., Barron, A.B. The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 51: 499-509, 2020.
- Covaci, B., Brejea, R., Covaci, M. Sweeteners world trade and behaviour in the pandemic. Evidence from honey remedies nexus mountain *Apis mellifera*. *Sugar Technology* 25: 938-949, 2023
- Christie, A. E. Assessment of midgut enteroendocrine peptide complement in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 116: 103257, 2020.
- Cruz-Landim, C. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo, Editora UNESP, 408 p, 2008.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J.E. Ultrastructure and Histochemistry of the Mineral Concretions in the Midgut of Bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology* 47: 21-29, 1997
- Dai, P.L., Wang, Q., Sun, J.H., Liu, F., Wang, X., Wu, Y.Y., Zhou, T. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honey bee *Apis mellifera ligustica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 644-649, 2010
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Taleb-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204: 111108, 2020

- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., Vontas, J. How do oral insecticidal compounds cross the Insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 103: 22- 35, 2018
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. Sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81–106, 2007
- Dias, W.C.S., Teixeira, E.W., Serrão, J. E. Regeneragive cells in the midgut o the honey bee *Apis mellifera* (Apidae: Apini) queens with different ages. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 67: e24230473, 2024
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., Armengaud, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honey bee (*Apis mellifera*). *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 54: 653–661, 2008
- Erlandson, M., Toprak, U., Hegedus, D. Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of Insect Physiology* 117: 1-11, 2019
- European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam considering all uses other than seed treatments and granules. 2015
- Farder-Gomes, C.F., Fernandes, K.M., Bernardes, R.C., Bastos, D.S.S., Martins, G.F., Serrão, J.E. 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* 145679, 2021
- Farder-Gomes, C.F., Grella, T.C., Malaspina, O., Nocelli, R.B.C. Exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate harm the behavior and fat body cells of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Science of The Total Environment* 907: 168072, 2024

- Farder-Gomes, C.F. et al. Exposure to low-concentration fipronil impairs survival, behavior, midgut morphology and physiology of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 358: 142240, 2024
- Fernandes, K.M., Araújo, V.A., Serrão, J.E., Martins, G.F., Campos, L.A., Neves, C.A. Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 56: 489, 2010
- Feyereisen, R. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44: 507-533, 1999
- Fiaz, M., Martínez, L.C., Costa, M.S., Cossolin, J.F.S., Rueda, A.P., Gonzaga, W.G., Santana, A.E.G. et al. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156: 1-8, 2018
- Garibaldi, L.A., Dewenter, I.S., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C. et al. Wild pollinators enhance the fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 340: 1608-1611, 2013
- Gomes, D.S., Miranda, F.R., Fernandes, K.M., Farder-Gomes, C.F., Bastos, D.S.S., Bernardes, R.C., Serrão, J.E. Acute exposure to fungicide fluazinam induces cell death in the midgut, oxidative stress and alters behavior of the stingless bee *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 282: 116677, 2024
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 6229, 2015
- Grab, H., Branstetter, M.G., Amon, N., Urban-Mead, K.R., Mia, P.G., Gibbs, J., Blitzer, E.J. et al. Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. *Science* 363: 282-284, 2019
- Grillone, G., Laurino, D., Manino, A., Porporato, M. Toxicity of thiamethoxam on in vitro reared honey bee brood. *Apidologie* 48: 635-643, 2017

- Gruter, C. Evolution and diversity of stingless bees. *Fascinating Life Sciences* 1: 43-86, 2020
- Gullan, P. J., Cranston, P. S. *The insects: an outline of entomology*. Vol. 4, John Wiley , Sons,. 565 p, 2010.
- Guo, W., Kain, W., Wang, P. Effects of disruption of the peritrophic membrane on larval susceptibility to *Bt* toxin Cry1Ac in cabbage loopers. *Journal of Insect Physiology* 117: 1-6, 2019
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 25: 7130–7139, 1974
- Hadwan, M.H., Abed, H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief* 6: 194-199, 2016
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54: 285-302, 2009
- Hung, K.L.J., Kingston, J.M., Albretch, M., Holway, D.A., Kohn, JR. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B* 285: 20172140, 2018
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23: 371-378, 2004
- Jameel, M., Alam, M.F., Younus, H., Jamal, K., Siddique, H.R. Hazardous sub-cellular effects of Fipronil directly influence the organismal parameters of *Spodoptera litura*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172: 216-224, 2019
- Ju., J., Qi, Z., Cai, X., Cao, P., Liu, N., Wang, S., Chen, Y. Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathways in HL-60 cells. *Toxicology in vitro* 27: 232-238, 2013

- Kakamand, F., Talal T., Mahmoud, A. The role of three insecticides in disturbing the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. Journal Dohuk University 11: 154-151, 2008
- Ki, Y.W., Li, J.E., Park, JH., Shin, I.C., Koh, H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. Toxicology Letters 211: 18-28, 2012
- Klein, A.M., Boreux, V., Fornoff, F., Mupepele, A.C., Pufal, G. Relevance of wild and managed bees for human well-being. Current Opinion in Insect Science 26: 82-88, 2018
- Komoike, Y., Inamura, H., Matsuoka, M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. Archives of Toxicology 86: 37-44, 2012
- Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. Cell Death , Differentiation 14: 32-43, 2007
- Lage, J.L. The amilases of insects. International Journal of Insect Science. 10: 1179543318804783, 2018
- Leite, D.T., Sampaio, R.B., Chambó, E.D., Aguiar, C.M.L., Godoy, M.S., Carvalho, C.A.L. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. International Journal of Tropical Insect Science 42: 435-443, 2022
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shatiel, S. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 186: 464-478, 1990
- Li, H., Tan, J., Song, X., Wu, F., Tang, M., Hua, Q., Zheng, H., Hu, F. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function. Biochemical and Biophysical Research Communications 486:

391-397, 2017

Li, S., Yu, X., Feng, Q. Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64: 315-333, 2019

Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52: 231-253, 2007

Lillie, R.D. Acid-fast stains. In: Lillie, R.D. *Histopathological technic and practical histochemistry*. 3rd ed. London, McGraw-Hill, 1965. pp. 575-81.

Lipovšek, S., Letofsky-Papst, I., Hofer, F., Pabst, M.A. Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). *Micron* 33: 647-654, 2002

Liu, X., Cooper, A., Zhang, J., Zhu, K. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology* 114: 109-115, 2019.

Lu, C., Yu, T.H., Chenq, Q. A Review of sub-lethal neonicotinoid insecticides exposure and effects on pollinators. *Current Pollution Reports* 6: 137-151, 2020

Luo, B., Lin, E., Jiang, S., Huang, L., Yao, H., Zhuang Q., Zhao, R. et al. Endoplasmic reticulum stress eIF2 α -ATF4 pathway-mediated cyclooxygenase-2 induction regulates cadmium-induced autophagy in kidney. *Cell Death, Disease* 7: e2251, 2016

Maienfisch, P., Angustia, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, E. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science*. 57: 906-913, 2001

Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47: 469-474, 1974

Martínez, L.C., Rueda, A.P., Neves, G.S., Gonçalves, W.G., Zanúncio, J.E., Bozdogan, H.,

- Serrão, J.E. Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 212: 629-637, 2018
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A., Serrão, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37: 161-168, 2006
- Martins, G.F., Serrão, J.E., Ramalho-Ortigão, J.M., Pimenta, P.F. Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body: effects of aging and diet type. *Microscopy Research Technique* 74: 1032-1039, 2011
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22: 573-580, 2001
- Matsuda, K., Ihara, M., Sattelle, D.B. Neonicotinoid insecticides: Molecular targets, resistance and toxicity. *Annual review of Pharmacology and Toxicology* 60: 241-255, 2020
- Michener C.D. *The Bees of the World*. Baltimore. The Johns Hopkins 2: 803-829, 2007
- Mittapalli, O., Neal, J.J., Shukle, R.H. Antioxidant defense response in a galling insect. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 104: 1889-1894, 2007
- Morais, C.R., Travençolo, B.A.N., Carvalho, S.A, Beletti, M.E., Vieira, V.S., Campos, C.F., Campos, E.O. et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). *Chemosphere* 206: 632-642, 2018
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Bayo, F.C., Liess, M., Cavallaro, M.C., Lisber, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environmental International* 74: 291-303, 2015
- Motta, J.V.O. et al. Midgut cell damage and oxidative stress in *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae) workers caused by the insecticide lambda-cyhalothrin.

Antioxidants 12: 1510, 2023

Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M.A., Raihan, M., Prova, S.R., Mitra, S., Emran, T.B., Simal-

Gandara, J. Pharmaceutical prospects of bee products: special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. *Antibiotics* 10: 822, 2021

Nation, J. L. *Insect physiology and biochemistry*. Vol. 4, CRC press, 586 p, 2022

Neves, C.A., Gitirana, L.B., Serrão, J.E. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology* 63: 683-690, 2003

Nicodemo, D, Mingatto, F.E., De Jong, D., Bezerra, P.F.V., Tavares, M.A., Bellini, W.C., Vicente, E.F. et al. A Mitochondrial Respiratory Inhibition Promoted by Pyraclostrobin in Fungi is Also Observed in Honey Bees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39: 1267-1272, 2020

Nocelli, R., Roat, T., Zacarin, E., Malaspina, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. *Semana dos Polinizadores* 3:196-212, 2012

Oliveira, A., Souza, A., Resende, M., Carneiro, L., Oliveira, J., Serra, R., Serrão, J. The peritrophic matrix delays *Nosema ceranae* infection in the honey bee *Apis mellifera* midgut. *Physiological Entomology* 48: 1–7, 2022

Oliveira, R.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O. Side effects of thiamethoxam on the brain and midgut of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Toxicology* 29: 1122-1133, 2013

Oliveira, M.S., Pereira, G.S., Martinez, L.C., Reis, A.B., Resende, M.T.C.S, Silva, L.L, Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. Effects of chronic oral exposure to insecticide teflubenzuron on the midgut of the honey bee *Apis mellifera* workers: histopathological insights into pesticide toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 31: 44908-44919, 2024

- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326, 2011
- Padilha, A.C, Piovesan, B., Morais, N.C., Pazini, J.B., Zotti, M.J., Botão, M., Grutzmacher, A.D. Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Ecotoxicology* 29: 119–128, 2020
- Pen, Y., Yang, E.C. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific Reports* 19298, 2006
- Pinal, N., Calleja, M., Morata, G. Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open Biology* 9: 180256, 2019
- Popp, J., Peto, K., Nagy, J. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33: 243-255, 2013
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta* 38: 63-70, 2002
- Rader, R, Bartomeu, I., Garibaldi, L.A., Garrat, M.P.D., Howlett, B.G., Winfree, R., Cunningham, S.A. et al. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *PNAS* 113: 146-151, 2015
- Reis, A.B., Oliveira, M.S., Souza, D.S., Gomes, D.G., Silva, L.L., Martínez, L.C., Serrão, J.E. Exploring the effects of the acaricide cyflumetofen on the vital organs of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) workers. *Science of The Total Environment* 929: 172640, 2024
- Reynolds, E.S. Use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212, 1963
- Salcher, S., Hermann, M., Kohlendorfer, U.K., Ausserlechner, M.J., Obexer, P.

- C10ORF10/DEPP-mediated ROS accumulation is a critical modulator of FOXO3-induced autophagy. *Molecular Cancer* 16: 95, 2017
- Sánchez-Bayo, F. , Koga, K. Pesticide residues and bees - a risk assessment. *PLOS One*, 9: 1-16, 2014
- Santos, A.D, Zanneti, R., Santos, J.C., Biagiotti, G., Evangelista, A.L., Serrão, J.E., Zanúncio, J.C. Persistence of fipronil residues in Eucalyptus seedlings and its concentration in the insecticide solution after treatment in the nursery. *Environmental Monitoring Assessment* 188: 314, 2016
- Santos, D.E., Zanuncio, J.C., Oliveira, A.A. O., Serrão, J. E. Endocrine cells in the midgut of bees (Hymenoptera: Apoidea) with different levels of sociability *Journal of Apicultural Research* 54: 394-398, 2015
- Santos J.R, V.C., Martínez, L.C., Rueda, A.P., Bozdogan, H., Zanúncio, J.C., Serrão, J.E. Exposure to spinosad induces histopathological and cytotoxic effects on the salivary complex of the non-target predator *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 225: 688-695, 2019
- Schumaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T., Terra, W.R. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie* 24: 3-17, 1993
- Serra, R., Cossolin, J., Resende, Matheus T.C.R, Castro, M., Oliveira, A., Martínez, L., Serrão, J.E. Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 270: 1-8, 2021
- Serra, R.S, Martínez, LC., Cossolin, J.F.S., Resende, M.T.C.S., Carneiro, L.S., Fiaz, M., Serrão, J.E. The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*

32: 234-242, 2023

Serrão, J.E., Cruz-Landim, D. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*, 1-6, 1996

Silva, S.M., Serrão, J.E., Mezêncio, J.M.S. Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides: immunolocalization of secretory sites. *Acta Histochemica* 107: 23-30, 2005

Simon-Delso, N, Rogers, A.V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, S., Baixos, C., Furlan, L. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 5–34, 2015

Siviter, H., Muth, S. Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects. *Biological Sciences* 287 (1935), 2020

Skowronek, P., Wójcik, L., Strachecka, A. Fat body-multifunctional insect tissue. *Insects* 12:547, 2021

Solomon, R.W. Free and open source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology* 192, 2009

Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174, 1967.

Stoner, K., Eitzer, B. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLOS One*, 913 7: e39114, 2012

Sule, R.O., Condon, L., Gomes, A.V. A common feature of pesticides: oxidative stress—the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1: 5563759

Syromyatnikov, M.Y., Kokina, A.V., Lopatin, A.V., Starkov, A.A., Popov, V.N. Evaluation

- of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 135: 41-46, 2017
- Taatjes, D.J., Sobel, B.E., Budd, R.C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemical Cellular Biology*, 129: 33-43, 2008
- Tavares, D.A. 2011. Análise morfológica e imuno-citoquímica do cérebro de abelhas africanizadas *Apis mellifera* após exposição a doses subletais do inseticida tiametoxam. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro/SP.
- Tavares, D.A., Dussalbat, C., Kretzschmar, A., Carvalho, S.M., Zacarin, E.C.M.S., Malaspina, O., Berail, G. et al. Belzunces, L.P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental Pollution* 229: 386-393, 2017
- Teixeira, A.D., Araújo, S.M., Zanúncio, J.C., Serrão, J.E. Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron* 68: 91-97, 2015
- Teixeira, A., Marques-Araujo, S., Zanuncio, J.C. Serrão, J.E. Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, 58: 463-468, 2019
- Terra, W.R., Barroso, I.G., Dias, R.O., Ferreira, C. Molecular physiology of insect midgut. *Advances in Insect Physiology*, 56: 117-163, 2019
- Terra, W.R., Ferreira, C. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthropod Structure and Development* 56: 100931, 2020
- Thapa, S., Lv, M., Xu, H. Acetylcholinesterase: a primary target for drugs and insecticides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 17: 1665-1676, 2017
- Tooker, J.F., Pearsons, K.A. Newer characters, same story: neonicotinoid insecticides disrupt food webs through direct and indirect effects. *Current Opinion in Insects*

Science 46: 50-56, 2021

Uhl, P., Bruhl, A. The impact of pesticides on flower-visiting insects: a review with regard to European risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38: 2355-2370, 2019

Villapando Rodriguez, G.E., Gibson, S.B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1: 9912436, 2021

Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I. Kuhn, R. McMahon, DP., Mendrzycki, P., et al. *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal Apicultural Research* 52: 1–36, 2013

Wintermantel, D., Jean-François, O., Axel, D., Mickael, H., Fabrice, AVincent, B. Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Science of the total Environmental* 135400, 2020

Yang, E.C., Chang, H.C., Wu, W.Y., Yu, W.C. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLOS One* e49472, 2012

Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 101: 1743-1748, 2008

Yoder, J.A., Jajack, A.J., Rosselot, A.E., Smith, T.J., Yerke, M.C., Sammataro, D. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera* colonies, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76: 587-600, 2013

Zattara, E.E., Aizen, M.A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4: 114-123, 2021

Zhang, L., Xia, Q., Zou, Y., Li, J. Endoplasmic reticulum stress and autophagy contribute to cadmium-induced cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Toxicology Letters* 311: 105-113, 2019

Zioga, H., Kelly, R., White, B., Stout, J.C. Plant protection product residues in plant pollen and nectar: a review of current knowledge. *Environmental Research* 189 (109873), 2020