

ANDRÉ HENRIQUE DE OLIVEIRA

***Nosema ceranae* E *Apis mellifera*: PROTEÇÃO PELA MATRIZ PERITRÓFICA E
AÇÃO DE SAIS DERIVADOS DE DITIOCARBIMATOS NO CONTROLE DA
INFEÇÃO**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadora: Luanda Medeiros Santana

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

O48n
2022
Oliveira, André Henrique de, 1991-
Nosema ceranae e Apis mellifera: proteção pela matriz peritrófica e ação de sais derivados de ditiocarbimatos no controle da infecção / André Henrique de Oliveira. - Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (42 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f.16-22.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.199>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas. 2. Intestinos. 3. *Nosema ceranae*. 4. Testes de toxicidade. 5. Ditiocarbimatos. I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

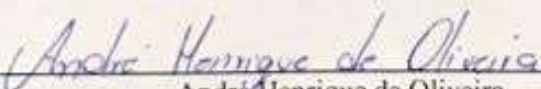
ANDRÉ HENRIQUE DE OLIVEIRA

***Nosema ceranae* E *Apis mellifera*: PROTEÇÃO PELA MATRIZ PERITRÓFICA E
AÇÃO DE SAIS DERIVADOS DE DITIOCARBIMATOS NO CONTROLE DA
INFECÇÃO**

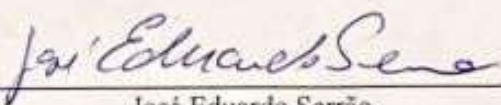
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022

Assentimento:



André Henrique de Oliveira
Autor



José Eduardo Serrão
Orientador

Dedico este trabalho a todos os cientistas e profissionais da saúde que durante a pandemia de SARS-COV-2 estiveram em campo de batalha para dar esperança à sociedade. Meu mais sincero obrigado! E meu profundo pesar e respeito por aqueles que não tiveram a chance de prosseguir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao meu orientador Dr. José Eduardo Serrão, por dividir seus conhecimentos e abrir as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver o meus.

Agradeço ao Dr. Edmilson Amaral de Souza, por ter visto em mim, em 2011, um potencial. Muito obrigado por me orientar no início da minha vida acadêmica. Sou extremamente grato.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e cada um de seus servidores, em especial a Beth, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular.

Agradeço também a todos os colegas e amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular que dividiram em algum momento o ambiente laboratorial comigo. Estar cercado de pessoas tão incríveis certamente estimulou meu crescimento profissional.

Agradeço ao grupo de estudo de abelhas, que juntos comigo dividiram cada obstáculo, e construímos protocolos e projetos incríveis.

Agradeço a todos os meus amigos pessoais, os que estão ao meu lado fisicamente e aos que não estão.

E por fim, agradeço e dedico cada palavra desde documento aos meus familiares. Essa conquista é de todos nós.

*“Um novo tempo há de vencer
Pra que a gente possa florescer
E, baby, amar, amar sem temer”.*

Johnny Hooker feat. Liniker – Flutua

RESUMO

OLIVEIRA, André Henrique de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. ***Nosema ceranae* e *Apis mellifera*: proteção pela matriz peritrófica e ação de sais derivados de ditiocarbimatos no controle da infecção.** Orientador: José Eduardo Serrão

A abelha *Apis mellifera* é considerada um dos maiores polinizadores naturais do mundo. Sua preservação vem sendo alvo de estudos devido a grandes declínios populacionais, muitas vezes relacionados com questões como perda de habitat, uso indiscriminado de agroquímicos e infecções por patógenos. Esse trabalho traz informações sobre como a matriz peritrófica influencia na infecção por *Nosema ceranae* e investiga a capacidade de controle dessa doença com a utilização de compostos derivados de ditiocarbimatos. Primeiro, através de técnicas histológicas e ultraestruturais, foi avaliada a função que a matriz peritrófica possui na proteção contra o patógeno *Nosema ceranae*, mostrando que sua ausência afeta a concentração de esporos em indivíduos infectados e acelera o ciclo completo da infecção possibilitando liberação de novos esporos mais rapidamente para infecções sequenciais. Na segunda parte, ditiocarbimatos, compostos agroquímicos apresentados como possíveis alternativas menos tóxicas, foram testados para o controle de esporos de *N. ceranae*. Compostos não tóxicos às abelhas foram testados e mostraram possuir diferentes níveis de controle sobre o esporo de *N. ceranae* tanto em testes *in vitro*, como *in vivo*. Sendo assim, esse trabalho suporta o papel protetivo da matriz peritrófica no grau de infecção e comprova que compostos derivados de ditiocarbimato possuem potencial como agentes de proteção contra *N. ceranae* em *A. mellifera*.

Palavras-chave: Abelhas. Intestino-médio. Matriz peritrófica. *Nosema*. Toxicidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, André Henrique de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. ***Nosema ceranae* and *Apis mellifera*: protective role of the peritrophic matrix and action of salts derived from dithiocarbamate in infection control.** Adviser: José Eduardo Serrão

The honeybee *Apis mellifera* is considered one of the most important natural pollinators in the world. Its preservation has been the subject of studies due to large population declines, often related to issues such as habitat loss, indiscriminate use of agrochemicals and infections by pathogens. This work provides information on how the peritrophic matrix influences in *Nosema ceranae* infection and investigates the ability to control this disease with the use of compounds derived from dithiocarbamates. First, the role that the peritrophic matrix plays in protecting against the pathogen *Nosema ceranae* was evaluated, showing that its absence affects the concentration of spores in infected individuals and accelerates the complete cycle of infection, allowing the release of new spores more quickly for sequential infections. In the second part, dithiocarbamates, agrochemical compounds presented as possible less toxic alternatives, were tested for the control of *N. ceranae* spores. Some compounds showed high toxicity to bees and were discarded. Those non-toxic were tested and shown to have different levels of control over the *N. ceranae* spore both in *in vitro* and *in vivo* tests. Therefore, this work supports the protective role of the peritrophic matrix in the degree of infection and proves that compounds derived from dithiocarbamate have potential as protective agents against *N. ceranae* in *A. mellifera*.

Keywords: Bees. Midgut. *Nosema*. Peritrophic matrix. Toxicity

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
CAPÍTULO 1.....	13
CAPÍTULO 2	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS	42

INTRODUÇÃO

Apis mellifera é uma abelha de hábito social considerada como o polinizador de maior importância econômica globalmente, sendo associada a polinização de cerca de 80% de toda agricultura (Breeze et al., 2011; Carreck & Williams, 1998). Além de seu papel ecológico, abelhas participam da produção de produtos apícolas que são amplamente utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (Zbucnea, 2017). A saúde desse polinizador tem sido alvo de grande preocupação, principalmente devido a muitos fatores de interação que podem declinar sua população, como má nutrição, mudanças climáticas, perda de habitat, exposição a produtos tóxicos e patógenos. Fatores esses que são associados ao declínio populacional e ao distúrbio do colapso das colônias (CCD), que é um evento em que abelhas adultas desaparecem de suas colmeias abandonando provisões, rainha e indivíduos imaturos (Lee et al., 2015).

A maioria dos insetos possui uma estrutura que auxilia na proteção contra fatores externos, a matriz peritrófica, que é uma estrutura semipermeável que reveste todo o alimento no intestino médio. A função da matriz peritrófica (MP) está intimamente associada ao mecanismo digestivo do inseto, compartimentalizando a digestão, auxiliando na proteção contra a invasão de patógenos, e proteção física contra possíveis danos físicos causados pelo alimento (Peters, 1992; Lehane 1997, Higes et al., 2007).

Dentre os patógenos que possuem forte influência negativa na saúde da colônia, os microsporídeos do gênero *Nosema* se destacam devido ao seu alto grau de patogenicidade em ampla gama de hospedeiros, podendo variar de insetos até mamíferos, incluindo humanos. Dentre seus representantes estão aproximadamente 322 espécies, incluindo *Nosema ceranae* que foi isolada da abelha asiática *Apis cerana* na China (Fries et al., 1996), *Nosema apis* que foi isolada na abelha europeia *Apis mellifera* (Zander, 1909) e *Nosema neumannii*, isolada na abelha africana em Uganda (Chemurot et al., 2017)

O ciclo de vida de *N. ceranae* ocorre exclusivamente em células epiteliais do ventrículo de abelhas (Higes et al., 2019); e pode ser classificado em diferentes fases, sendo: a fase infecciosa, aquela em que os esporos maduros sofrem estímulos externos, ativando-os para que assim possam infectar as células hospedeiras através do tubo polar, que é uma estrutura com função de perfurar a célula e assim poder transferir o seu material genético no hospedeiro; a fase proliferativa, quando os esporos iniciam o processo de multiplicação dentro

da célula hospedeira; e a fase esporogônica, processo em que quitina e proteínas se acumulam na parede do esporo para maturação e liberação da célula hospedeira para um novo ciclo de infecção (Lom & Vavra, 1963, Chen et al., 2017, Martin-Hernández et al., 2018,).

A infecção por *Nosema* spp. é denominada nosebose em *A. mellifera* e é causadora de diversas consequências como, morte prematura de indivíduos, perda de colônias, supressão de imunidade e maior suscetibilidade a tóxicos (Sprague & Becnel, 1998, Pettis et al., 2013). O antibiótico isolado do fungo *Aspergillus fumigatus*, a fumagilina, tem sido o tratamento mais utilizado por quase 60 anos para seu controle (Higes et al., 2011). Porém, sua utilização tem sido questionada devido ao surgimento de forte resistência ao tratamento, assim como, devido questões de toxicidade a outros organismos seu uso vêm sendo banido em diversos países (Botias et al., 2012). Assim é necessária a busca por novos compostos para o controle desses patógenos que além de eficientes sejam seguros para saúde humana e com baixo impacto ambiental.

Os ditiocarbamatos são fungicidas protetores derivados do ácido ditiocarbâmico, amplamente utilizados como defensivos agrícolas devido à sua alta eficiência no controle de doenças fúngicas e baixa volatilidade (Hogarth, 2005). No entanto, derivados de ditiocarbamatos podem gerar como produto final do metabolismo, compostos tóxicos como etilenotiuréia (Gullino et al., 2010). Assim, derivados de ditiocarbimato, que são compostos semelhantes aos ditiocarbamatos, vem sendo estudados como candidatos a novos fungicidas por não apresentarem produtos de decomposição tóxicos, como se verificam com alguns ditiocarbamatos comerciais. Por isso a importância do estudo dos derivados de ditiocarbimatos como novos agroquímicos pois apresentam uma demanda de estudos específicos de seus representantes.

Este trabalho traz informações sobre o papel protetor que a matriz peritrófica possui contra a infecção por *Nosema ceranae*, como também avalia o possível uso de compostos derivados de ditiocarbimatos no controle dessa infecção em *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Breeze, T. D., Bailey, A. P., Balcombe, K. G., Potts, S. G. (2011). Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142(3-4), 137-143.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., Higes, M. (2012) *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 57-65.
- Carreck, N., Williams, I. (1998). The economic value of bees in the UK. *Bee world*, 79(3), 115-123.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., de Graaf, D. C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European journal of protistology*, 61, 13-19.
- Chen, J., Guo, W., Dang, X., Huang, Y., Liu, F., Meng, X., An, Y., Long, M., Bao, J., Zhou, Z., Xiang, Z., Pan, G. (2017). Easy labeling of proliferative phase and sporogonic phase of microsporidia *Nosema bombycis* in host cells. *PloS One*, 12(6), e0179618.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, SB., Pieniazek, NJ. (1996). *Nosema ceranae* n. sp.(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356-365.
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garubaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L., Sheppard, B. (2010). Mancozeb: Past, present, and future. *Plant Disease*, 94(9), 1076- 1087.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of invertebrate pathology*, 94(3), 211-217.
- Higes, M., García-Palencia, P., Urbietta, A., Nanetti, A., Martín-Hernández, R. (2019). *Nosema apis* and *Nosema ceranae* tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary pathology*, 57(1), 132-138.
- Higes, M., Nozal, M. J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., Bernal, J. L., Bernal, J. (2011) The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema*

- ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* 42: 364–377.
- Hogarth, G. (2005). Transition metal dithiocarbamates: 1978–2003. *Progress in inorganic chemistry*, 53, 71-561.
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., Rose, R., Delaplane, K. S., Baylis, K., Lengerich, E. J., Pettis, J., Skinner, J. A., Wilkes, J. T., Sagili, R. (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292-305.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525-550.
- Lom, J., Vavra, J. (1963). The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozoologica*,; 1, 81-92.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., Garcia-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M. A., Soroker, V., Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology*, 20(4), 1302-1329
- Peters, W., (1992). Peritrophic matrix. In: Bradshaw, D.; Burggren, W.; Heller, H.C.; Ishii, S.; Langer, H.; Neuweiler, G.; Randall, D.J. (Eds.), *Zoophysiology*. 1–238.
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.
- Sprague, V., Becnel, J. J. (1998). Note on the name-author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, 91–94.
- Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196–204
- Zbucnea, A. (2017). Honey, Food and medicine: scientific rationale and practical efficiency in external administration of medicinal honey for wound healing. *Journal of Agriculture Science Technology B*, 7, 206-219.

CAPÍTULO 1

A presença da matriz peritrófica interfere na infecção de *Nosema ceranae* em *Apis mellifera*

RESUMO

O intestino médio das abelhas é um órgão dinâmico que participa principalmente da digestão e absorção de nutrientes e está em constante contato com o ambiente e agentes tóxicos. Como método de proteção ao organismo, o intestino médio é revestido por uma estrutura denominada matriz peritrófica, que é composta principalmente por cadeias de quitina ligadas a proteínas que formam múltiplas camadas de caráter resistente e gelatinoso. Dentre suas funções está a barreira mecânica contra a infecção por patógenos. Os patógenos mais comuns de abelhas incluem o microsporídeo intracelular obrigatório *Nosema ceranae* que tem trazido danos às colônias de *Apis mellifera*, sendo vinculado à morte prematura de indivíduos, danos à produção apícola e aumento de susceptibilidade a agrotóxicos. Assim, este trabalho avaliou se a integridade da matriz peritrófica participa da proteção contra a infecção por *N. ceranae* em *A. mellifera*. A integridade da matriz peritrófica foi alterada pela alimentação das abelhas com Calcofluor White. Os resultados mostram que o Calcofluor White a 0,5% afeta a integridade da matriz peritrófica com áreas de interrupção desse envelope. Essa desorganização da matriz peritrófica resulta na diminuição do tempo de ciclo de vida de *N. ceranae* de oito para quatro dias após a inoculação e aumenta a concentração de esporos encontrados nos primeiros dias pós-inoculação. Este estudo traz dados sobre a importância da membrana peritrófica como barreira protetora contra infecção do patógeno *N. ceranae* em *A. mellifera*.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as três regiões do trato digestório dos insetos (intestino anterior, médio e posterior), o intestino médio é o principal local de digestão e absorção dos nutrientes, sendo responsável pela produção das enzimas digestivas e pela absorção da maior parte dos nutrientes (Terra & Ferreira, 2020). Diferente das regiões anterior e posterior, que possuem um revestimento interno de cutícula, o intestino médio está revestido pela matriz peritrófica (MP) constituída por uma rede de quitina com proteínas associadas, que pode ser produzida por toda extensão do intestino médio, caracterizando a MP do tipo I, ou somente por uma região do intestino denominada cárdia, caracterizando MP do tipo II de acordo com o grupo de insetos (Peters, 1992; Terra & Ferreira, 1994).

A MP é uma estrutura semipermeável com considerável resistência e elasticidade (Peters, 1992; Tellam, 1996; Lehane, 1997). A participação da quitina e glicoproteínas na permeabilidade da matriz peritrófica foi comprovada em diferentes insetos, tanto na variação da quantidade de quitina (Kelkenberg et al., 2014), quanto na ligação quitina-proteína (Oliveira et al., 2019).

Embora a MP envelope o alimento que chega ao intestino médio, ela é uma estrutura multifuncional, auxiliando na passagem de alimento, impedindo que as células intestinais sofram algum dano (Lehane, 1997; Martin et al., 2006), compartimentando a digestão nos espaços endo- e ectoperitróficos (Terra, 2001); inativando toxinas ingeridas (Wang et al., 2012) e atuando como barreira física impedindo a ação de compostos tóxicos (Hegedus, 2009, Chen et al., 2021). Dada a importância da MP no intestino dos insetos, sua desestruturação tem sido foco de estudo para controle de insetos praga em culturas agrícolas (Konno & Mitsuhashi, 2019; Chen et al., 2021).

Além dessas funções, a MP possui um papel direto na proteção contra invasão de patógenos. Infecções derivadas de *Plasmodium* spp. em mosquito *Aedes aegypti* com MP artificialmente espessada, resultam menor quantidade de oocistos do protozoário (Billingsley e Rudin, 1992). A moscas tsétsé com MP danificada apresenta maior suscetibilidade à infecção com tripanossomas (Aksoy, 2019). Em lagartas *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera), esporos de *Nosema fumiferanae* foram relatados na MP (Nolan & Clovis, 1985). Em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera), foi demonstrado que a MP é degradada pela bactéria *Bacillus thuringiensis* como chave para o sucesso de sua infecção (Fang et al., 2009). Em

abelhas *Apis mellifera*, algo similar ocorre com a infecção por *Paenibacillus larvae*, que possui genes responsáveis pela degradação da MP (Garcia-Gonzalez et al., 2014).

Alguns estudos que visam entender a desestruturação da MP utilizam-se da inoculação de Calcofluor White (CFW) que é um fluorocromo não específico que se liga à celulose e à quitina, comumente usado como um método rápido para a detecção de leveduras e fungos patogênicos. Este composto inibe a formação da MP em lagartas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera), perturbando o sistema de defesa do intestino médio e aumentando a infecção por baculovírus (Wang & Granados, 2000). Outros trabalhos inferem a utilização de quitinase como estratégia para inibir a defesa mecânica que a MP exerce contra parasitas (Fang et al., 2009; Garcia-Gonzalez et al., 2014).

Em abelhas *A. mellifera* a MP é do tipo I e com aspecto gelatinoso composta por várias camadas que apresentam diferenças morfológicas quanto ao posicionamento, sendo mais delgadas quando em contato com espaço ectoperitrófico (espaço que compreende a região MP – epitélio), enquanto na região de contato com espaço endoperitrófico (região MP – Lumén) são mais densas e espessas (Teixeira et al., 2019).

Nosema ceranae pertence à classe Microsporídia, um grupo de eucariotos unicelulares obrigatoriamente intracelulares com importância médica e veterinária podendo infectar de insetos a mamíferos (Weiss & Becnel, 2014). *N. ceranae*, ainda que por muito tempo tenha sido relatado capaz de infectar apenas abelhas adultas, também foi encontrado em pré-pupas de *A. mellifera*, porém, exclusivamente em condições laboratoriais (Eiri et al., 2015), inclusive demonstrando que abelhas adultas que tiveram infecção em fase larval podem apresentar uma série de problemas patológicos na fase adulta (Ben-Vau e Nieh, 2017).

O ciclo de vida desse microsporídeo se caracteriza por diferentes fases, sendo elas: i) a ingestão dos esporos e início da germinação, que envolve a extrusão do tubo polar e introdução do esporoplasma na célula hospedeira; ii) a multiplicação; iii) o espessamento, que é a deposição de material eletrodense nas membranas celulares; e iv) a liberação de parte da célula hospedeira contendo esporos maduros para o lumén do intestino seguido de excreção com as fezes (Bigliardi & Sacchi, 2001; Han & Weiss, 2017; Martin-Hernández et al., 2018). Não existem relatos de estágios de parasitas ou lesões celulares em outros órgãos além do intestino médio (Higes et al., 2019). O tempo para que esse ciclo de vida e a infecção ocorra

no organismo alvo pode variar de três até 12 dias após inoculação dos esporos, considerando o início até o desenvolvimento total da infecção (Higes *et al.*, 2007; Forsgren & Fries, 2010).

Os danos causados por *Nosema* spp. em *A. mellifera* incluem morte prematura dos indivíduos (Higes *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2015), maior suscetibilidade a pesticidas (Pettis *et al.*, 2013), baixa produção de mel (Seitz *et al.*, 2016), supressão significativa da resposta imune e alteração na produção de feromônios (Paris *et al.*, 2018).

Tendo em vista o exposto, pesquisas que visam desvendar os mecanismos que envolvem a infecção de *A. mellifera* por *N. ceranae* são necessárias, especialmente quanto à função da MP nesse processo. Assim, este estudo tem por objetivo avaliar se a matriz peritrófica possui papel protetivo sobre a infecção por *N. ceranae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Abelhas

Favos de cria de uma colônia saudável de *A. mellifera* africanizadas foram coletados no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O) e mantidos em BOD a 32 ± 2 ° C com umidade 71% para que fossem coletadas abelhas recém-emergidas livres de *Nosema* spp. Operárias recém-emergidas foram cuidadosamente removidas, separadas em três grupos de 80 indivíduos e confinadas em gaiolas plásticas de 500 mL e mantidas a 32 ± 2 ° C por 24 h sendo alimentadas com pólen coletado de colônias de *A. mellifera* (previamente testado para ausência de *Nosema*). O pólen foi retirado durante os experimentos.

2.2 Calcofluor White (CFW)

Para avaliação do efeito do CFW na matriz peritrófica e sua toxicidade em abelhas *A. mellifera*, três grupos de 80 abelhas, para cada teste, foram alimentadas *ad libitum* com solução de sacarose 50% contendo 1% e 0,5% (m/v) de CFW por 52 h (Wang e Granados, 2000). O grupo controle foi alimentado apenas com solução sacarose 50%.

Para avaliação de sua toxicidade, todos os grupos foram avaliados a cada 24 horas por 52 horas consecutivas, abelhas mortas eram retiradas e contabilizadas para testes subsequentes. Para avaliação de alterações na estrutura da MP, seis operárias de cada grupo foram coletadas nos intervalos de 24 e 48 h de exposição, os intestinos médios foram

dissecados, transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967), desidratados em série de etanol e embebidos em historesina (Leica). Secções com 3 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas por microscópio de luz.

2.3 Isolamento de esporos de *N. ceranae*

Para obtenção de esporos de *N. ceranae* foram coletadas operárias em colônias de *A. mellifera* naturalmente infectadas. As abelhas foram dissecadas e os intestinos retirados e macerados em 1 mL de água destilada por indivíduo. O macerado foi filtrado em algodão esterilizado para remoção de tecidos indesejados e centrifugado a 5000 g por 5 min por três vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em água destilada e homogeneizado. A seguir, uma alíquota foi analisada em câmara de Neubauer para contagem e definição da concentração da solução de esporos (Fries et al., 2013).

2.4 Avaliação no tempo de infecção

Operárias de *A. mellifera* (n = 240) foram transferidas para três gaiolas (80 abelhas cada) e alimentadas, *ad libitum*, com solução sacarose 50% contendo 12500 esporos de *N. ceranae* por μL por 24 horas. Após esse tempo, o alimento foi substituído por solução sacarose 50% livre de esporos. Posteriormente, cinco abelhas foram coletadas diariamente por 12 dias consecutivos, dissecadas e tiveram seus intestinos médios examinados por análise histológica como descrito no item 2.2 para verificar a ocorrência do microsporídeo dentro das células do intestino.

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Cinco abelhas com 8, 9 e 10 dias após a exposição aos esporos de *N. ceranae* como descrito acima foram dissecadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M, pH 7,2. O intestino médio foi retirado e transferido para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M por 4 h em temperatura ambiente. Os intestinos foram então submetidos a duas lavagens em solução tampão, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 2 h, desidratadas em série de etanol graduado (70%, 80%, 90%, 95% e 99%) e embutidas em resina LR White. Cortes ultrafinos (80-90 nm) realizados em ultramicrotomo Sorval MT2-BMT2-B foram submetidos a 1% de acetato de uranila aquoso por 10 min e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 3 min para contrastação. As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

2.6 Infecção de abelhas expostas ao CFW

Operárias de *A. mellifera* (n = 240) com 48 h de exposição oral ao CFW 0,5% foram isoladas em gaiolas (80 operárias cada) e alimentadas com solução de sacarose 50% contendo esporos isolados de *N. ceranae* em concentração de 12500 esporos por μL por 24 h e CFW 0,5% (Higes et al., 2007). Após exposição de 24 h à solução com esporos, o alimento foi substituído por solução sacarose 50% + CFW 0,5% livre de esporos. Cinco operárias foram coletadas diariamente por oito dias consecutivos e o intestino médio dissecado e analisado histologicamente para verificar a infecção por esporos de *N. ceranae* como descrito no item 2.2.

2.6 Avaliação quantitativa de esporos

Oito grupos contendo 30 abelhas cada foram expostos ao CFW 0,5% por 24 h e inoculadas com esporos de *N. ceranae* como descrito no item 2.5. Nos intervalos de tempo de 4 e 8 dias pós inoculação, 10 abelhas foram aleatoriamente coletadas e submetidas a contagem da concentração de esporos presentes no trato digestivo com auxílio da câmara de Neubauer, como descrito no item 2.3. A mesma quantidade de abelhas foi analisada no grupo controle, sem exposição ao CFW. As análises estatísticas ANOVA unidirecional e teste de Tukey com 5% de significância foram realizadas com software SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011). Os dados são relatados como os valores médios de todas as réplicas.

3. RESULTADOS

Operárias expostas à solução de sacarose com CFW a 1% apresentaram uma alta taxa de mortalidade, e foram desconsiderados para análises posteriores. Indivíduos que foram expostos à concentração 0,5% de CFW apresentaram baixa mortalidade, semelhante ao controle (Fig. 1).

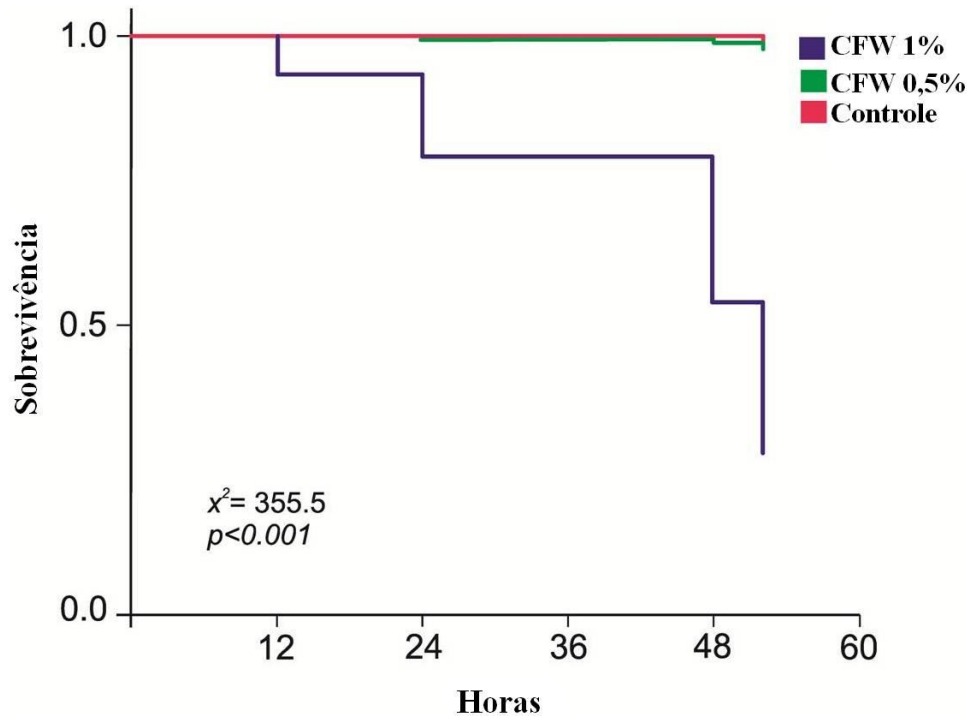


Figura 1. Mortalidade de abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas expostas a solução sacarose 50% em concentração 0,5% e 1% de calcofluor White (CFW). As curvas de mortalidade foram analisadas através dos estimadores de Kaplan- Meier e o procedimento não paramétrico LIFETEST do SAS Institute.

Abelhas controle apresentaram MP com múltiplas camadas de aspecto lamelar e contínua por toda a extensão do intestino médio envelopando o alimento (Fig. 2 A). Em abelhas expostas a solução CFW 0,5% a MP teve a conformação alterada para aspecto granular e completamente ausente em algumas regiões do intestino médio (Fig. 2 B e C), porém, nenhum dano ao epitélio do intestino médio foi observado.

Abelhas controle não apresentaram infecção por *N. ceranae* durante o experimento, comprovando que as abelhas recém-emergidas são isentas de pré-infecção pelo microsporídeo.

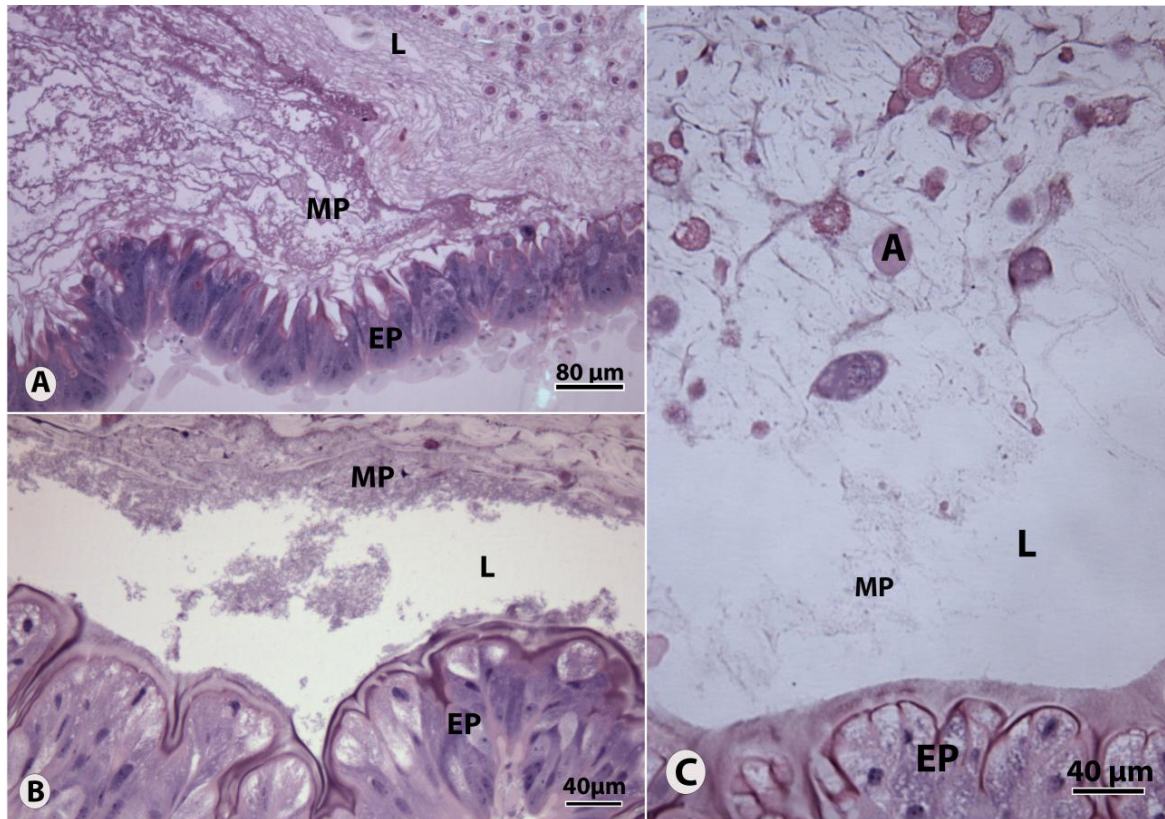


Figura 2. Micrografias de luz do intestino médio de operárias de *Apis mellifera*. [a]: Controle com matriz peritrófica (MP) organizada em camadas. [b e c]: Regiões do intestino médio de abelhas tratadas com 0,5% de calcofluor white por 24 h com matriz peritrófica (MP) desestruturada. A – Alimento. EP – epitélio; L – Lúmen.

Em operárias do grupo exposto à solução de esporos de *N. ceranae* ocorreu a liberação de novos esporos junto com fragmentos celulares, a partir do oitavo dia de inoculação (Fig. 3 A, 3 B e 4 A). Há presença de esporos maduros, não somente confinados dentro de fragmentos celulares (Fig. 4 B), mas também entre as várias camadas da MP também foi observada (Fig. 3 A).

As operárias de *A. mellifera* alimentadas previamente com CFW 0,5% e expostas aos esporos de *N. ceranae* apresentaram a liberação de novos esporos no lúmen a partir do quarto dia pós-inoculação (Fig. 3 C), tendo assim, uma diminuição de 50% no tempo para se iniciar um ciclo com a liberação de novos esporos.

Em abelhas submetidas ao tratamento com CFW 0,5%, no quarto dia pós-inoculação, a concentração média de esporos encontrados foi de $11,2 \times 10^6$ por abelha, enquanto no oitavo dia a concentração foi $14,32 \times 10^6$. Na ausência do CFW 0,5% a concentração de esporos

encontrados foi de $7,1 \times 10^6$ e $17,5 \times 10^6$ aos quatro e oito dias, respectivamente (Fig. 5). Todos os grupos foram estatisticamente diferentes entre si ($F= 1.814$; $p < 0,05$).

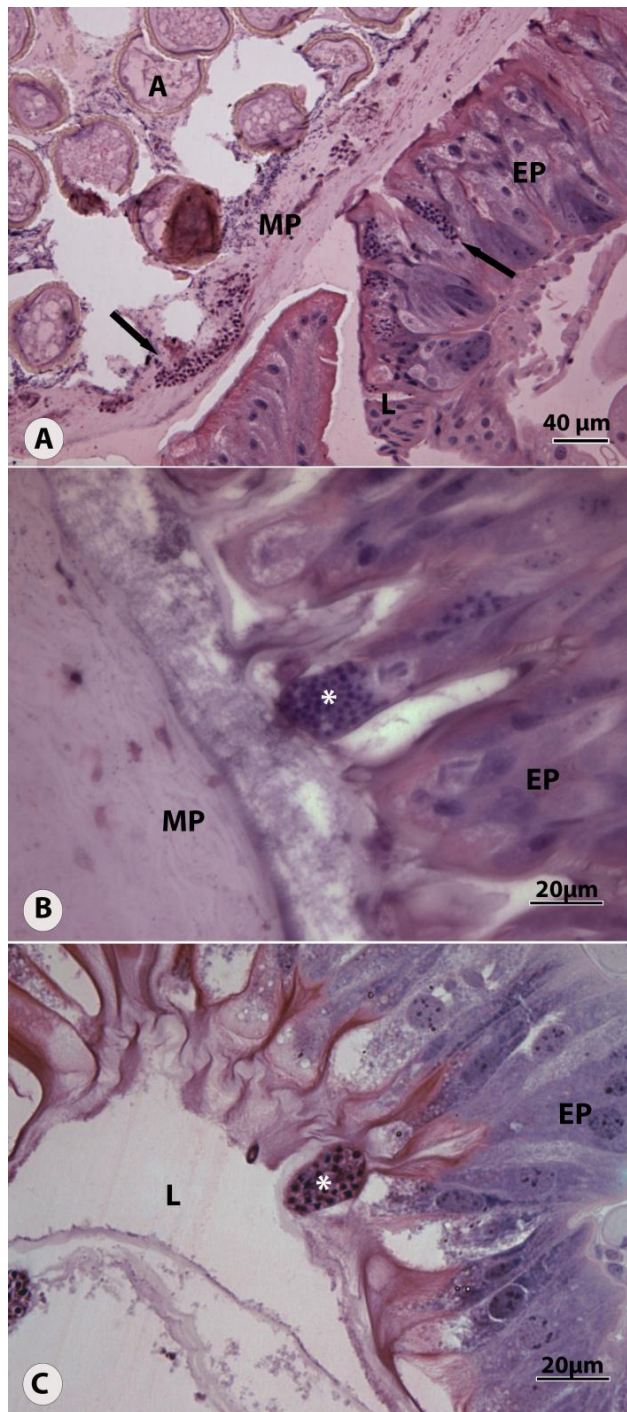


Figura 3. Micrografias de luz do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* tratadas com calcofluor white 0,5% e infectadas com esporos de *Nosema ceranae*. [A]: Região de intestino médio infectada com esporos de *N. ceranae* (setas) oito dias pós-inoculação em fragmentos celulares na matriz peritrófica (MP) e no epitélio (EP). [B]: Detalhe de célula do epitélio com protrusão apical rica em esporos de *N. ceranae* (asterisco) no intestino médio 8 dias pós inoculação. [C]: Célula do epitélio com protrusão apical rica em esporos de *N. ceranae* (asterisco) no intestino médio 4 dias pós-inoculação. Note a matriz peritrófica (MP) desorganizada. A – Alimento; L – Lúmen.

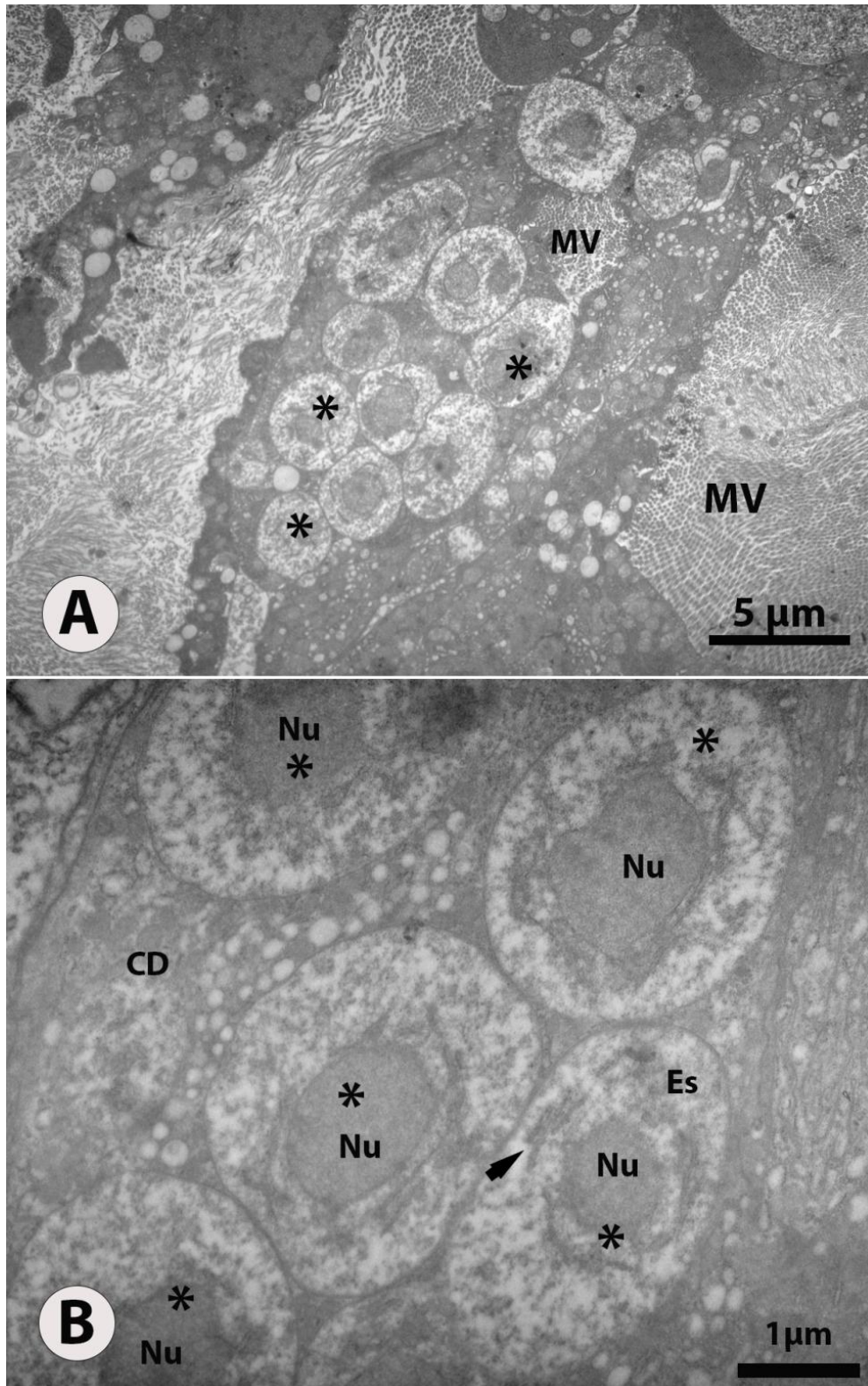


Figura 4. Micrografias eletrônicas de transmissão de intestino médio de operárias de *Apis mellifera* infectadas com *Nosema ceranae*. [A] Região apical de célula digestiva durante liberação de fragmento celular contendo esporos de *N. ceranae* (asterisco). [B] Esporos de *N. ceranae* (asteriscos) no interior de célula digestiva (CD) de *A. mellifera* com filamento polar (seta) circundando o núcleo do esporo (Nu). Es – Esporoplasma; MV – Microvilosidades das células digestivas;.

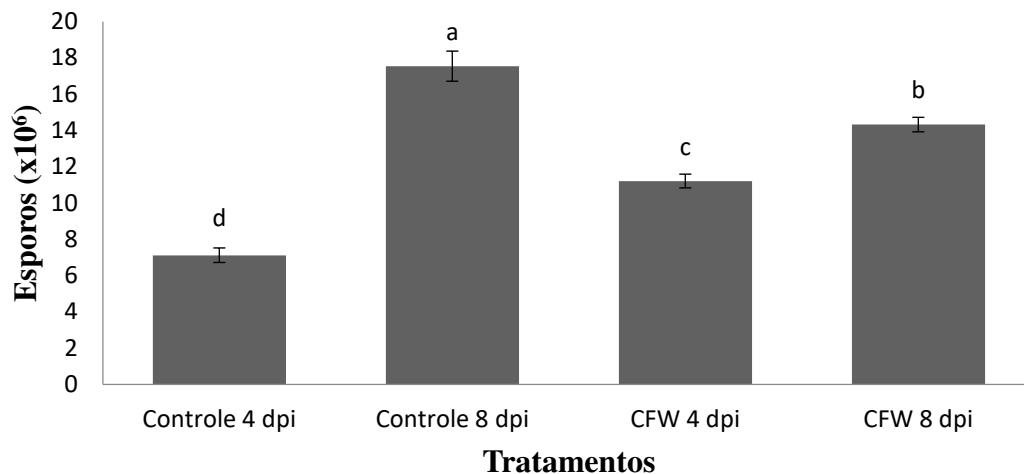


Figura 5. Concentração de esporos de *Nosema ceranae* no intestino médio de operárias de *Apis mellifera* nos intervalos de tempo de 4 e 8 dias pós-inoculação (d.p.i.), comparando controle e tratamento com calcofluor white 0,5% (CFW). Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados são indicadas com letras minúsculas (ANOVA, teste de Tukey $p \leq 0,05$). As barras representam os erros-padrão dos dados.

4. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a interação do calcofluor white (CFW) com a matriz peritrófica (MP) de *A. mellifera* resulta em desmontagem da estrutura lamelar comum da MP, o que pode ser devido à forte interação que as moléculas de CFW possuem com moléculas de quitina recém sintetizadas, como relatado para lepidópteros (Wang & Granados, 2000; Ress et al., 2009). O CFW se mostra um competidor para proteínas constituintes da MP, resultando em sua desestruturação, similar ao que ocorre na presença de anticorpos anti-peritrofinas, as quais também ocupam um sítio de ligação com a quitina e alteram a permeabilidade da MP em abelhas (Oliveira et al., 2019). Devido à produção da MP em abelhas ser realizada continuamente e por toda a extensão do intestino médio, o que caracteriza a MP do tipo I (Teixeira et al., 2015), possivelmente, haverá regiões do intestino médio que apresentam desestruturação da MP, devido à interação CFW-quitina, e outras regiões mantêm a estrutura comum, formando assim, regiões com áreas afetadas e não afetadas pelo CFW.

A avaliação do tempo de infecção mostra a liberação de novos esporos a partir de oito dias após a inoculação (d.p.i.) em *A. mellifera*. O tempo de infecção em abelhas por *N. ceranae* é ainda discutido, sendo relatados com 3 d.p.i (Higes et al., 2007), 5 d.p.i (Eiri et al., 2015), 10 a 12 d.p.i (Forsgren e Fries, 2010). A possível diferença na patogenicidade de *N.*

ceranae pode estar relacionada com variações genéticas conforme a localização geográfica do microsporídeo (Higes et al., 2013). A diferença no tempo de infecção pode ainda estar relacionada com a metodologia utilizada para a infectar as abelhas, se individual ou em grupo (Forsgren & Fries, 2010). Eiri (2015) sugere que a diferença nesse tempo pode ser influenciada pela quantidade de esporos disponibilizados no momento da infecção. Porém, com a adição de CFW e a consequente desestruturação da MP, os dados aqui obtidos mostram tempo reduzido para apenas 4 d.p.i. em comparação com 8 d.p.i. no controle o que suporta o papel de barreira mecânica da MP em *A. mellifera* contra *N. ceranae*.

A análise da concentração de esporos mostrou que a desestruturação da MP induzida pelo CFW afeta a concentração total de esporos, com alta concentração de esporos nos primeiros dias de infecção, o que pode estar relacionado, além de seu papel de barreira mecânica, com a propriedade que a MP possui de afetar diretamente a microbiota intestinal do inseto, que tem importante papel protetivo contra *N. ceranae* em *A. mellifera* (Li et al., 2017; Rodgers et al., 2017).

Tendo em vista que a liberação de novos esporos é a principal forma de dispersão e infecção por *Nosema* spp., a diminuição no tempo do ciclo reprodutivo com a desestruturação da MP, implica diretamente em uma maior virulência individual e dispersão dentro da colônia. Assim, a MP, mesmo não protegendo completamente contra a infecção, desempenha um importante papel protetivo na infecção por *N. ceranae*, atrasando a liberação de novos esporos desse fungo em 100% do tempo. Esse resultado indica que, funcionando como barreira física, ou através de sua influência na microbiota intestinal da abelha, a MP exerce função protetiva na infecção de *N. ceranae* em *A. mellifera*, afetando o tempo para infecção máxima, assim como a quantidade de esporos no intestino médio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksoy, S. (2019). Tsetse peritrophic matrix influences for trypanosome transmission. *Journal of insect physiology*, 118, 103919.
- BenVau, L. R., Nieh, J. C. (2017). Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Bigliardi, E., Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect*, 3, 373-9.
- Billingsley, P. F., Rudin, W. (1992). The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of Plasmodium species. *The Journal of parasitology*, 78(3), 430-440.
- Chen, C., Chen, H., Huang, S., Jiang, T., Wang, C., Tao, Z., He, C., Tang, Q. Li, P. (2021). Volatile DMNT directly protects plants against *Plutella xylostella* by disrupting the peritrophic matrix barrier in insect midgut. *Elife*, 10, e63938.
- Eiri, D. M., Suwannapong, G., Endler, M., Nieh, J. C. (2015). *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*, 10(5), e0126330.
- Fang, S., Wang, L., Guo, W., Zhang, X., Peng, D., Luo, C., Yu, Z., Sun, M. (2009). *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5237-5243.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahan, D. P., Martín-Hernandez, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.
- Forsgren, E., Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), 212-217.
- Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., Genersch, E. (2014). *Paenibacillus* larvae chitin-degrading protein Pl CBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004284.

- Han, B., Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *The fungal kingdom*, 97-113.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U. (2009). New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, 54, 285-302
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of invertebrate pathology*, 94(3), 211-217.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 17-29.
- Higes, M., García-Palencia, P., Urbietta, A., Nanetti, A., Martín-Hernández, R. (2019). *Nosema apis* and *Nosema ceranae* tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Pathology*, 57(1), 132-138.
- Huang, W. F., Solter, L., Aronstein, K., Huang, Z. (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of invertebrate Pathology*, 124, 107-113.
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21-28.
- Konno, K., Mitsuhashi, W. (2019). The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103912.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525-550.
- Li, J. H., Evans, J. D., Li, W. F., Zhao, Y. Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., Li, Z. G., Hamilton, M., Chen, Y. P. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One*, 12(11), e0187505.

- Martin, G. G., Simcox, R., Nguyen, A., Chilingaryan, A. (2006). Peritrophic Membrane of the Penaeid Shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, Formation, and Permeability. *Biological Bulletin*, 211,: 275–285.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., Garcia-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M. A., Soroker, V., Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1302-1329
- Nolan, R. A., Clovis, C. J. (1985). *Nosema fumiferanae* release into the gut of the larvae of the eastern spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 45, 112–114.
- Oliveira, A. H.; Fernandes, K. M.; Gonçalves, W. G.; Zanuncio, J. C.; & Serrão, J. E. (2019). A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. *Arthropod structure & development*, 53, 100885.
- Paris, L., El Alaoui, H., Delbac, F., Diogon, M. (2018). Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 149-154.
- Peters, W. (1992). Peritrophic matrix. In: Bradshaw, D.; Burggren, W.; Heller, H.C.; Ishii, S.; Langer, H.; Neuweiler, G.; Randall, D.J. (Eds.), *Zoophysiology*. 1–238.
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.
- Rees, J. S., Jarrett, P., Ellar, D. J. (2009). Peritrophic membrane contribution to Bt Cry δ -endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 139-146.
- Reynolds, E. S., (1963). Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biology*. 17, 208–212.
- Rodgers, F. H., Gendrin, M., Wyer, C. A. S., Christophides, G. K. (2017). Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathogens*, 13(5), e1006391.

- Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., Rose, R., Tarpy, D. R., Sagili, R. R., Caron, D. M., Delaplane, K. S., Rangel, J., Lee, K., Baylis, K., Wilkes, J. T., Skinner, J. A., Pettis, J. S. vanEngelsdorp, D.. (2016). A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 292-304.
- Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174..
- Teixeira, A. D. D., Marques-Araújo, S., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2015). Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron*, 68, 91-97.
- Teixeira, A. D. D., Marques-Araújo, S., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2019). Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, 58(3), 463-468.
- Tellam, R. L. (1996). The peritrophic matrix. In: Lehane, M. J.; Billingsley, P. F.; (Eds) *Biology of the insect midgut*. London: Chapman and Hall. 86–114.
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry*, 47,:47-61
- Terra, W. R., Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109: 1-62.
- Terra, W. R., Ferreira, C. (2020). Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthropod Structure Development*, 56, 100931.
- Wang, L.; Li, F.; Wang, B.; Xiang, J. (2012). Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunology*, 33,: 1285-1291.
- Wang, P., Granados, R. R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), 135-143.
- Weiss LM, Becnel JJ (ed). (2014). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom.

CAPÍTULO 2

Ação de sais derivados de ditiocarbimatos na sobrevivência de *Apis mellifera* e controle de *Nosema ceranae*

RESUMO

Nosemose, é o nome dado a infecção por *Nosema ceranae* em *Apis mellifera* tem sido relacionada com aspectos negativos para a sobrevivência de abelhas. Os danos variam de menor produção de mel, alta mortalidade e colapso de toda colônia. Atualmente, o tratamento para essa infecção é realizado através do uso do antibiótico fumagilina, porém, há relatos de resistência ao tratamento e seu uso foi banido em diversos países devido à toxicidade. Compostos derivados de ditiocarbimatos, vem sendo estudados como alternativas menos tóxicas de compostos que são amplamente usados como fungicidas, os ditiocarbamatos. Este trabalho avaliou o perfil tóxico de seis derivados destes compostos na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* e sua possível função de controle do fungo *N. ceranae*. Quatro compostos foram selecionados pela baixa taxa de mortalidade nas abelhas e tiveram sua ação antifúngica avaliada. Testes *in vitro* mostraram que os quatro compostos apresentam capacidade de inviabilização de esporos, porém dois são mais efetivos, inviabilizando até 44% dos esporos. Testes *in vivo* apresentam resultados semelhantes, tendo os dois mesmos compostos controlando 62% dos esporos. A utilização de derivados de ditiocarbimatos se mostra promissora no controle de *N. ceranae*, porém sua toxicidade é um fator relevante ao estudar suas ações.

1. INTRODUÇÃO

Nosema ceranae é um microsporídeo que apresenta alto grau de patogenicidade na abelha *Apis mellifera* (Higes et al., 2007; Paxton et al., 2007), sendo a infecção natural associada ao alto índice de mortalidade, baixa produção de mel e a uma síndrome de despovoamento gradual até seis vezes maior quando comparadas com colônias não infectadas (Martín-Hernández et al., 2007). *Nosema ceranae* mostrou ter a capacidade de manipular e modificar o metabolismo de carboidratos em abelhas infectadas, sugerindo uma atividade do patógeno em garantir a disponibilidade de nutrientes para seu próprio benefício (Dussaubat et al., 2012). A presença de *N. ceranae* na colônia pode acarretar o aumento da mortalidade de abelhas forrageiras, que caso ultrapassasse um limiar crítico, a colônia colapsa ainda que alimentos estejam presentes (Higes et al., 2008; Goblirsch et al., 2013).

Em diversos países da Europa, colônias contaminadas com *Nosema* spp. apresentam maior mortalidade que as não contaminadas (Chauzat et al., 2016). Um estudo similar realizado nos EUA mostrou que os apicultores atribuíram a nosemose como causa de mortalidade de suas colônias em 53,9% dos casos (Seitz et al., 2016). No Brasil, apenas a *Nosema ceranae* foi detectada em apiários do estado de São Paulo (Guimarães-Cetaro et al., 2016), reforçando a hipótese de que este é o principal microsporídeo no Brasil (Teixeira et al., 2013). Possivelmente a distribuição generalizada de *N. ceranae* indica uma sobreposição específica sobre *Nosema apis* em *A. mellifera*, demonstrando a adaptação bem-sucedida de *N. ceranae* ao clima seco e quente (Martín-Hernández et al., 2009).

As abelhas normalmente são infectadas com *Nosema* spp. através da ingestão de esporos encontrados em alimentos e água contaminados, através da limpeza de favos contaminados (Higes et al., 2010) ou durante a trofalaxia (Smith, 2012). A infecção causa uma diminuição na longevidade de abelhas adultas, mudanças no comportamento e disenteria, o que pode levar à morte da abelha, e até mesmo de toda a colônia (Anderson & Giacón, 1992; Kralj & Fuchs, 2010).

Atualmente, o tratamento de nosemose em abelhas é realizado através da utilização de um antibiótico isolado do fungo *Aspergillus fumigatus*, a fumagilina (Williams et al., 2008; Higes et al., 2011). Porém algumas questões negativas envolvem sua utilização, incluindo resistência ao tratamento, principalmente devido ao uso prolongado do fungicida, somado ao

fato de não haver outro meio de controle que seja amplamente utilizado (Huang et al., 2013). Seu uso foi banido no Chile, Austrália, e alguns países da Europa por ser relacionado com alterações cromossômicas, e possuir atividade carcinogênica em humanos (Regulamento 2377/90 Comissão Europeia, 2009, Botías, 2012, van den Heever et al., 2014). Assim, faz-se necessário a pesquisa e utilização de métodos e fármacos alternativos para o controle de nosemose em *A. mellifera*.

Compostos derivados de ditiocarbimatos vêm sendo testados como antifúngicos de interesse agrário, sendo comprovadamente eficazes contra patógenos dos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia* e *Hemileia* (Alves et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Rabello, 2021). Estes compostos possuem proximidade estrutural com ditiocarbamatos, como o Mancozeb, amplamente conhecidos por sua capacidade antifúngica (Gullino et al., 2010). Porém, devido à possível relação entre a presença de ditiocarbamatos e a grande mortalidade de abelhas (Porrini et al., 2003), compostos alternativos se tornam necessários para manutenção da biodiversidade.

Assim, este estudo investigou a resposta toxicológica de seis compostos derivados de ditiocarbimatos em operárias de *A. mellifera* e sua possível atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* contra o microsporídeo *N. ceranae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Abelhas

Quadros de cria de uma colônia saudável de *A. mellifera* foram coletados em Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' N 42° 52' O). Estes foram mantidos em uma B.O.D a 32 ± 2 ° C para que fossem coletadas abelhas recém-emergidas livres de *Nosema* spp. As abelhas recém-emergidas foram removidas, confinadas em gaiolas de plástico (1 L) em grupos de 300 e mantidas na incubadora por 24 horas sendo alimentadas com pólen e mel. Após esse tempo as abelhas foram separadas em grupos de 80 indivíduos em gaiolas menores (500 mL) e alimentadas *ad libitum* com solução aquosa de sacarose a 50%.

2.2 Toxicidade para as abelhas

Seis sais derivados de ditiocarbimatos (Figura 1), em duas concentrações diferentes (20 e 100 $\mu\text{Mol L}^{-1}$), foram avaliados quanto à toxicidade para *A. mellifera*. Esses sais foram sintetizados e purificados no Laboratório de Síntese de Agroquímicos no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa e os dados foram comparados com dados na literatura e possuem alto grau de pureza (Albuini-Oliveira, 2020, Cunha et al., 2012 & Tavares, 2013). Devido à necessidade da utilização de diluição dos compostos em DMSO, também foram realizados testes de toxicidade para DMSO 0,1%. As abelhas, confinadas em número de 10 indivíduos por gaiola, foram alimentadas *ad libitum* com sais diluídos em solução de sacarose 50% nas concentrações de 20 e 100 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ e tiveram sua sobrevivência avaliada nos intervalos de 16h, 24h e 48h. Todos os testes foram feitos em triplicadas e repetidos duas vezes.

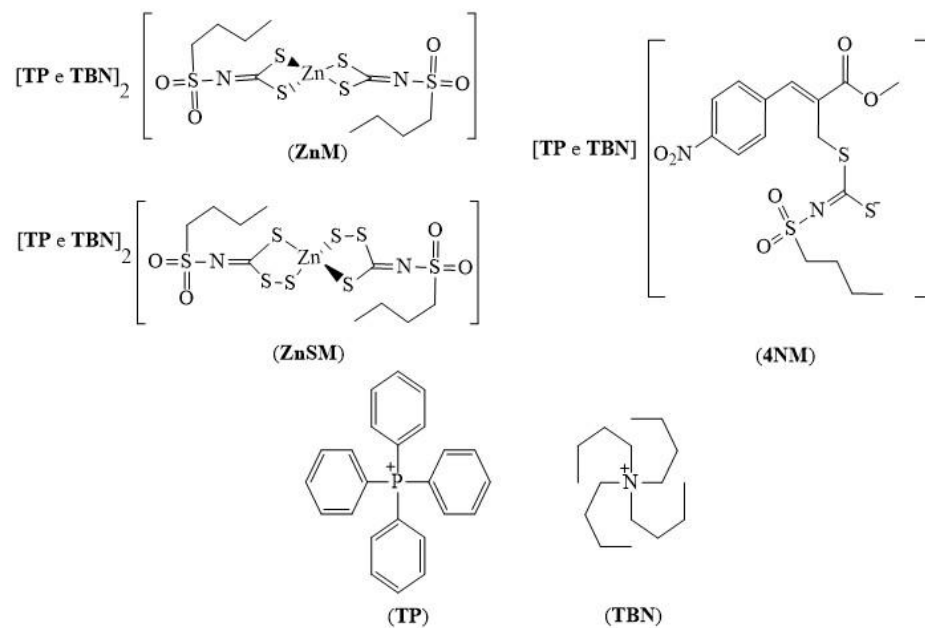


Figura1. Representação esquemática de sais derivados de ditiocarbimatos com cátions tetrafenilfosfônio (TP) e tetrabutilamônio (TBN).

2.3 Isolamento de esporos de *N. ceranae*

Para obtenção de esporos de *N. ceranae* foram utilizadas colônias de *A. mellifera* naturalmente infectadas, previamente confirmadas através de microscopia de luz. Abelhas foram agrupadas e seus intestinos macerados usando 1 mL de água destilada por indivíduo. O macerado foi filtrado em algodão e centrifugado a 5000 g por 5 minutos por três vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado re-suspenso em água destilada e homogeneizado

em vórtex. Após o isolamento dos esporos, uma alíquota foi depositada em câmara de Neubauer para contagem e definição da concentração da solução de esporos (Fries et al., 2013).

2.4 Infecção de abelhas

Abelhas recém-emergidas com até 24 h de idade, foram deixadas em jejum por 3 horas e então expostas a solução de sacarose 50% contendo esporos isolados de *N. ceranae* em concentração de 12500 esporos por μL por 24 h *ad libitum*. Abelhas controle foram alimentadas apenas com solução sacarose 50% livre de esporos. Após exposição, o alimento foi substituído por solução sacarose 50% livre de esporos até o fim do experimento.

2.5 Atividade antifúngica em esporos isolados

Abelhas naturalmente infectadas foram coletadas e submetidas a extração de esporos como descrito em 2.3. Três réplicas de suspensão de esporos foram então expostos a cada composto previamente selecionado, seguindo a concentração estipulada de 20 e 100 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ e mantidos por 1 h em temperatura ambiente. As réplicas foram então incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 30 minutos e lavadas duas vezes em água destilada por centrifugação a 5000 g por 5 min e o precipitado final foi ressuspensão para contagem em câmara de Neubauer utilizando microscópio de fluorescência. Para cada avaliação, os esporos foram contados primeiro sob luz fluorescente e em sequência em luz transmitida. Esporos não corados com DAPI foram considerados não infecciosos (McGowan et al., 2016).

2.6 Atividade antifúngica em abelhas infectadas

Os compostos selecionados como menos tóxicos para as abelhas foram dispostos para alimentação *ad libitum* de abelhas infectadas em laboratório como descrito anteriormente. Sete dias após a alimentação, as abelhas foram dissecadas, seus intestinos macerados para obtenção de esporos como descrito no item 2.3 para contagem em câmara de Neubauer.

2.7 Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011). Comparações entre os grupos controle e tratados com os compostos foram realizados

usando one-way ANOVA e o teste de Tukey. Os dados são relatados como os valores médios de todas as réplicas. Diferenças de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS

Os testes de toxicidade para as abelhas foram diferentes entre os compostos ($F= 117,81$; $p < 0,01$). TBNZnM, TBNZnSM e TP4NM na concentração de $20 \mu\text{Mol L}^{-1}$ e TBN4NM $100 \mu\text{Mol L}^{-1}$, apresentaram baixa porcentagem de mortalidade, enquanto os demais causaram maiores taxas de mortalidade (Tabela 1). Assim, os testes subsequentes seguiram apenas com esses compostos que apresentaram mortalidade reduzida a abelhas operárias de *A. mellifera*.

Tabela 1. Mortalidade média de abelhas \pm DP (%) de abelhas alimentadas com compostos derivados de ditiocarbimatos.

COMPOSTO (Conc. $\mu\text{MOL L}^{-1}$)	PORCENTAGEM DE MORTALIDADE
TBNZnM 20	$5 \pm 2,4$
TBNZnM 100	$23 \pm 5,3$
TPZnM 20	$6,6 \pm 5,1$
TPZnM 100	$63,3 \pm 4,0$
TPZnSM 20	$26,6 \pm 3,17$
TPZnSM 100	$58,3 \pm 7,5$
TBNZnSM 20	$5 \pm 2,3$
TBNZnSM 100	$26,6 \pm 5,1$
TBN4NM 20	$11,6 \pm 4,0$
TBN4NM 100	0
TP4NM 20	0
TP4NM 100	$46,6 \pm 8,1$
DMSO 0,1%	0

Esporos expostos *in vitro* aos compostos apresentaram uma queda significativa na taxa de viabilidade de $12,37 \pm 0,74 \times 10^6$ esporos viáveis no controle para $11,10 \pm 0,47 \times 10^6$ com TP4NM, $6,96 \pm 0,28 \times 10^6$ com TBNZnSM, $8,39 \pm 0,40 \times 10^6$ com TBNZnM e $7,56 \pm 0,38 \times 10^6$ com TBN4NM ($F= 419.950$; $p < 0,001$; Figura 2)

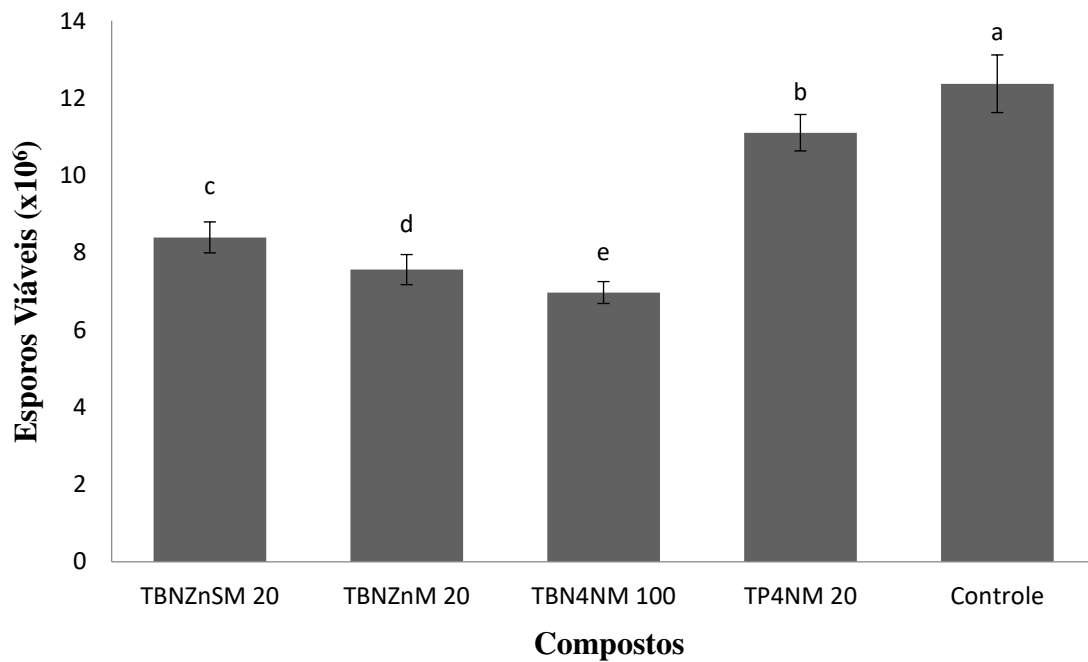


Figura 2. Número de esporos viáveis de *Nosema ceranae* após exposição a tratamentos com compostos derivados de ditiocarbimatos e grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas com letras minúsculas $p \leq 0,05$ (ANOVA, teste de Tukey). As barras de erro representam os erros-padrão das médias.

No tratamento de abelhas artificialmente infectadas, a concentração total de esporos variou significativamente ($F= 30.688$; $p<0,001$). O controle apresentou um total de $17,66 \pm 0,46 \times 10^6$ esporos por intestino no oitavo dia pós-inoculação, enquanto nas abelhas tratadas esses valores foram de $9,01 \pm 0,46 \times 10^6$ com TBNZnSM, $6,65 \pm 0,30 \times 10^6$ com TBNZnM, $6,56 \pm 0,42 \times 10^6$ com TBN4NM e $16,63 \pm 0,39 \times 10^6$ com TP4NM 20 (Figura 3).

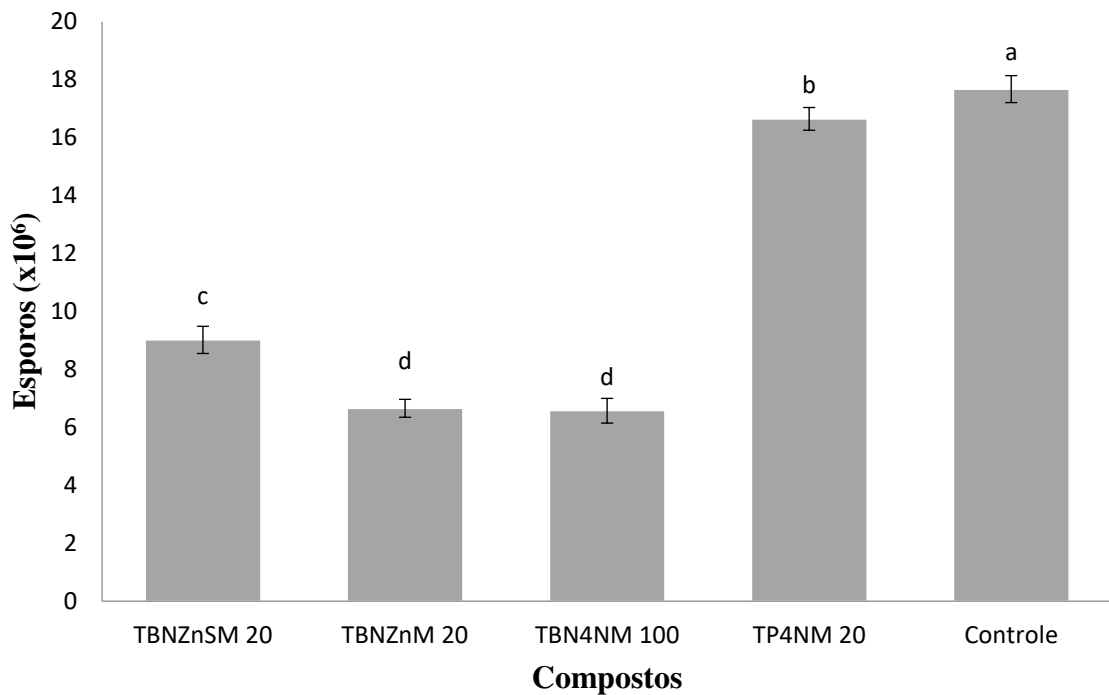


Figura 3. Número de esporos de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* oito dias pós-inoculação e tratadas com compostos derivados de ditiocarbimato. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados são indicadas com letras minúsculas $p \leq 0,05$ (ANOVA, teste de Tukey). As barras de erro representam os erros-padrão dos dados.

4. DISCUSSÃO

Abelhas foram expostas a sais derivados de ditiocarbimatos para verificar seus possíveis efeitos tóxicos. Os compostos TBNZnSM ($20 \mu\text{Mol L}^{-1}$), TBN4NM ($100 \mu\text{Mol L}^{-1}$), TBNZnM ($20 \mu\text{Mol L}^{-1}$) e TP4NM ($20 \mu\text{Mol L}^{-1}$), apresentam mortalidade semelhantes ao grupo controle sendo considerados pouco tóxicos para a abelha, ao contrário dos demais grupos. Os resultados sugerem que a parte catiônica dos sais parece contribuir significativamente para a toxicidade do composto, sendo os mais tóxicos os que possuem o tetrafenilfosfônio (TP) como cátion. Ditiocarbimatos mostram variações quanto à toxicidade em abelhas, sendo comumente encontrados em amostras de abelhas mortas, porém, o ditiocarbimato Mancozeb tem baixa toxicidade quando testado em *A. mellifera* (Porrini et al., 2003; Stanley, et al., 2015), demonstrando que a toxicidade a esses polinizadores pode variar dentro do próprio grupo do composto, sendo necessário que, assim como em compostos derivados de ditiocarbimatos, testes toxicológicos sejam realizados individualmente e de maneira mais detalhada para cada derivado de ditiocarbimato.

A análise *in vitro* da ação antifúngica dos compostos avaliados mostra que dentre os quatro selecionados, todos obtiveram uma resposta positiva, porém TBNZnM ($20 \mu\text{Mol L}^{-1}$) e TBN4NM ($100 \mu\text{Mol L}^{-1}$) reduziram em 39% e 44%, respectivamente, a viabilidade dos esporos, sendo mais promissores quanto ao controle de *N. ceranae*. É importante notar que, apesar do sal TBN4NM ($100 \mu\text{Mol L}^{-1}$) apresentar o melhor resultado *in vitro*, o sal TBNZnM ($20 \mu\text{Mol L}^{-1}$) possui resultado muito similar, porém em uma concentração 5 vezes menor que o composto TBN4NM. O modo de ação dos compostos ainda é desconhecido, mas a ação de compostos semelhantes em outros fungos ocorre pela a ação oxidativa no aminoácido cisteína ligado a proteínas, que são amplamente presentes em proteínas constituintes do tubo polar em *Nosema bombycis* que infecta o bicho-da-seda (Dias et al., 2010; Lv et al., 2020).

No teste referente à atividade *in vivo* dos derivados de ditiocarbimatos, os resultados demonstram uma forte queda na concentração de esporos em abelhas infectadas. Dentre os quatro compostos testados, todos obtiveram um resultado significativamente menor de esporos de *N. ceranae* no intestino que o controle, porém os compostos TBNZnM $20 \mu\text{Mol L}^{-1}$ e TBN4NM $100 \mu\text{Mol L}^{-1}$, novamente, foram aqueles que tiveram um melhor resultado, controlando cerca de 62% da proliferação de esporos. Levando em consideração que o teste *in vitro* obteve resultados semelhantes, porém em grau inferior, os dados do teste *in vivo* apontam que além do mecanismo de ação destes compostos, algum outro fator interfere no grau da infecção.

Este estudo traz importante informações sobre possíveis aplicabilidades e respostas ecológicas dos sais derivados de ditiocarbimatos, mostrando que sua toxicidade em abelhas campeiras *A. mellifera* é algo que precisa ser estudado individualmente para cada composto, não podendo inferir sua resposta apenas por agrupamento. Em contrapartida, sua capacidade de controle sobre esporos de *N. ceranae* se mostrou promissora, uma vez que respostas positivas foram observadas em todos os tratamentos. De maneira geral, os sais que apresentam como cátion o tetrabutylamônio (TBN) parecem contribuir mais para o controle sobre os esporos de *N. ceranae* ao mesmo tempo que apresentam menor toxicidade em abelhas *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuini-Oliveira, N. M. (2020). Atividades antifúngica e aceleradora da vulcanização da borracha natural de novos derivados de ditiocarbimatos. 313p. Tese de Doutorado – Programa de pós-Graduação em Agroquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Alves, L. C., Rubinger, M. M., Lindemann, R. H., Perpétuo, G. J., Janczak, J., Miranda, L. D., Zambolim, L. Oliveira, M. R. (2009). Syntheses, crystal structure, spectroscopic characterization and antifungal activity of new NR-sulfonyldithiocarbimate metal complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, 103(7), 1045-1053.
- Anderson, D. L., Giacon, H. (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *Journal of Economic Entomology*, 85, 47-51.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., Higes, M. (2012). *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 57-65.
- Chauzat, M. P., Jacques, A., Laurent, M., Bougeard, S., Hendrikx, P., Ribière-Chabert, M., Epilobee Consortium. (2016). Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie*, 47(3), 348-378.
- Cunha, L. M. G., Rubinger, M. M. M., Oliveira, M. R. L., Tavares E. C., Sabino J. R., Pacheco, E. B. A. V., Visconte L. L. Y., (2012). Syntheses, Crystal structure and spectroscopic characterization of *bis*(dithiocarbimato)zinc(II) complex: A new class of vulcanization accelerators. *Inorganica Chimica Acta*, 383, 194-198.
- Dias, P. J., Teixeira, M. C., Telo, J. P., Sa-Correia, I. (2010). Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 14(2), 211-227.
- Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F. A., Conte, Y. L., Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*, 7, e37017.

- European Commission. (2009). Commission Regulation No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L152/11L152/22.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernandez, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.
- Goblirsch, M., Huang, ZY., Spivak, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One*, 8,: e58165.
- Guimarães-Cestaro, L., Serrão, J. E., Alves, M. L. T. M. F., Teixeira, É. W. (2016). A scientific note on occurrence of pathogens in colonies of honey bee *Apis mellifera* in Vale do Ribeira, Brazil. *Apidologie*, 48(3), 384-386.
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garubaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L., Sheppard, B. (2010). Mancozeb: Past, present, and future. *Plant Disease*, 94(9), 1076- 1087.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernandez, R., Meana, A., (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375-392.
- Higes, M., Nozal, M. J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernandez, R., Bernal, J. (2011). The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 42, 364–377.

- Huang, W. F., Solter, L. F., Yau, P. M., Imai, B. S. (2013). *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003185
- Kralj, J., Fuchs, S. (2010). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, 41,21-8.
- Lv, Q., Wang, L., Fan, Y., Meng, X., Liu, K., Zhou, B., Chen, J., Pan, G. Zhou, Z. (2020). Identification and characterization a novel polar tube protein (NbPTP6) from the microsporidian *Nosema bombycis*. *Parasites & Vectors*, 13(1), 1-9..
- Martín-Hernandez, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailon, E., Barrios, L., Higes, M. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied Environmental Microbiology* 75, 2554–2557
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6331-6338.
- McGowan, J., De la Mora, A., Goodwin, P. H., Habash, M., Hamiduzzaman, M. M., Kelly, P. G., Guzman-Novoa, E. (2016). Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 131, 16-22.
- Oliveira, A. A., Oliveira, M. R., Rubinger, M. M., Piló, E. L., Menezes, D. C., Zambolim, L. (2015). Bis (4-fluorophenylsulfonyldithiocarbimato) zincate (ii) salts: new antifungals for the control of botrytis blight. *Química Nova*, 38, 757-761.
- Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38, 1–9.
- Porrini, C., Sabatini, A. G., Girotti, S., Fini, F., Monaco, L., Celli, G., Bortolotti, L., Ghini, S. (2003). The death of honey bees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicators. *Bulletin of insectology*, 56(1), 147-152.
- Rabello, A. S., (2021). Utilização de sulfonamidas como blocos de construção de novos agroquímicos protetores para o controle de doenças fúngicas. 229 p. Tese de Doutorado - programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., Rose, R., Tarpy, D. R., Sagili, R. R. Caron, D. M., Delaplane, K. S., Rangel, J., Lee, K., Baylis, K., Wilkes, J. T., Skinner, J. A., Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D. (2016). A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 292-304.

- Smith, M. L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One* 7, e43319.
- Stanley, J., Khushboo, S., Jain, K. S., Bhatt, J. C., Sushil, S. N. (2015). Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory, semi-field and field studies, *Chemosphere* 119, 668–674
- Tavares, E. C. Síntese e caracterização de derivados de sulfonamidas e de adutos de Morita-Baylis-Hillman e sua atividade antifúngica e aceleradora da vulcanização da borracha natural. 252p. Tese de Doutorado – Programa de pós-Graduação em Agroquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Teixeira, E. W., Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L., Martins, M. F., Grassi-Sella, M. L., Francoy, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114,: 250–254.
- van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Ibrahim, A., Pernal, S. F. (2014). Fumagillin: an overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), 2728-2737.
- Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D., Rogers, R. E. L. (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*, 99, 342–344.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostra que a matriz peritrófica pode, em certo nível, controlar a infecção de *Apis mellifera* por *Nosema ceranae* com o atraso no ciclo de vida do microsporídeo. Além disso, compostos derivados de ditiocarbimatos, que surgem como possíveis substitutos de fungicidas mais tóxicos, podem apresentar certo nível de toxicidade à abelhas, porém esse dado não se aplica a todos os representantes do grupo, sendo necessária a análise toxicológica de cada composto. Entretanto, a capacidade de controle da nosebose é promissora, devido a todos os compostos testados apresentarem dados positivos, chegando a diminuir a concentração de esporos em até 62% no intestino das abelhas infectadas.