

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MATEUS SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DO INSETICIDA TEFLUBENZUROM NO  
INTESTINO MÉDIO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**MATEUS SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DO INSETICIDA TEFLUBENZUROM NO  
INTESTINO MÉDIO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

O48e  
2023

Oliveira, Mateus Soares de, 1996-

Efeitos histopatológicos do inseticida teflubenzurom no intestino médio de operárias da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / Mateus Soares de Oliveira. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (39 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

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

Referências bibliográficas: f. 30-39.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.123>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Histopatologia. 2. Tenflubenzuron (Inseticida). 3. Colméias - Contaminação. I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 571.959


**MATEUS SOARES DE OLIVEIRA**

**EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DO INSETICIDA TEFLUBENZUROM NO  
INTESTINO MÉDIO DE OPERÁRIAS DA ABELHA *Apis mellifera*  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

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


APROVADA: 24 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 MATEUS SOARES DE OLIVEIRA  
Data: 22/06/2023 13:36:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Mateus Soares de Oliveira  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 JOSE EDUARDO SERRAO  
Data: 22/06/2023 08:55:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Eduardo serrão  
Orientador

Este trabalho é a colheita de muito auto sacrifício, estudo, dedicação e capricho. É o presente de uma caminhada de aprendizado que nunca se findará. Dedico a mim e a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para que esta etapa da minha vida se iniciasse e terminasse, igualmente como contribuem para que uma nova se inicie. Por fim, dedico às abelhas e insetos do mundo: vocês fazem o mundo melhor.

## AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela infraestrutura e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (cod. 01), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (303467/2018-5) e à Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-02367-18) apoio auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

A Todos os professores que compartilham seus conhecimentos e fazem parte de nossas jornadas acadêmicas.

Aos técnicos, funcionários públicos e terceirizados que contribuíram com esse trabalho e que contribuem diariamente à Universidade Federal de Viçosa.

Agradeço meu orientador, Dr. José Eduardo Serrão por ter aberto as portas de seu laboratório para mim. Obrigado pela confiança, por ter me ensinado, guiado e inspirado.

Ao professor Vinícius Albano Araújo por me apoiar desde a graduação e me incentivar a cursar mestrado nesta instituição.

Aos colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular. Muito obrigado Fran, por ter conseguido o inseticida para mim. Matheus, Lenise e Jamile por todas as conversas, conselhos e dicas, que sem dúvida, iluminaram todo meu caminho para a realização deste trabalho. Obrigado Aline pela companhia na criação das abelhas e conversas no micrótopo. Muito obrigado Giovanna por todos os meses cortando meus materiais e por me ensinar a ser mais organizado.

À minha família por todo o auxílio, suporte, carinho, amparo e companheirismo, em especial, meus pai, minha mãe, minha tia Mara e meu irmão Vinicius.

## RESUMO

OLIVEIRA, Mateus Soares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Efeitos histopatológicos do inseticida teflubenzurom no intestino médio de operárias da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).** Orientador: José Eduardo Serrão.

A abelha *Apis mellifera* desempenha papel como polinizadora de plantas nativas e cultivadas, atuando no aumento da produtividade de diversas culturas, na preservação da flora e na produção de sementes florestais. Um fenômeno que vem preocupando os pesquisadores e agricultores é o declínio da população de abelhas, incluindo *A. mellifera* que apresentam o Distúrbio do Colapso de Colônias (CCD), tendo como uma das possíveis causas o uso excessivo de agrotóxicos nas plantações. O teflubenzurom é um inseticida do grupo benzoiluréia, que inibe a síntese de quitina, um dos principais componentes do tegumento do inseto na formação do exoesqueleto, entretanto sua ação em órgãos não alvos de insetos é ainda desconhecida. O intestino médio é a principal região do trato digestório com função de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, estando exposto à ação de pesticidas ingeridos com o alimento. O objetivo foi avaliar os efeitos tóxicos e histopatológicos no intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera* causados pela exposição oral crônica ao teflubenzurom. Operárias expostas ao teflubenzurom por oito dias tem alta mortalidade, apresentando 13% de sobrevivência em relação ao grupo controle. Abelhas tratadas com teflubenzurom apresentam o epitélio do intestino médio com excessiva vacuolização, esferocristais, secreção apócrina, picnose nuclear, liberação de fragmentos celulares para o lúmen do órgão, perda do contato celular, danos nos ninhos de células regenerativas e na matriz peritrófica. Os resultados indicam que o inseticida inibidor da síntese de quitina, teflubenzurom, é tóxico para *A. mellifera* após exposição oral crônica em concentração campo-realista, embora seja classificado como pouco ou não tóxico para insetos adultos e não-alvos.

Palavras-chave: Inseticida. Abelha. Histopatologia.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Mateus Soares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Histopathological effects of the insecticide teflubenzuron in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (hymenoptera: apidae) workers.** Advisor: José Eduardo Serrão.

The honey bee *Apis mellifera* plays a role as pollinator of native and cultivated plants, increasing the productivity of several cultures, preserving the flora and producing forest seeds. However, bee populations undergo decline worldwide, including *A. mellifera* with the Colony Collapse Disorder (CCD), in which one of the main causes is the constant use of pesticides in the crops. Teflubenzuron is a physiological insecticide, belonging to the benzoylurea group, which acts inhibiting chitin synthesis, the main component of the insect integument classified as safe for non-target insects, including bees. However, its effect on non-target organs of insects remains unknown. The midgut is the main organ of the digestive tract with the function of digestion and absorption, which may be exposed to pesticide contaminating food resources. The objective of this study was to verify if the insecticide teflubenzuron is toxic and has histopathological effects in the midgut of *A. mellifera* adult workers. Workers exposed orally chronically to the field-realistic concentration of teflubenzuron have 87% of mortality. The midgut of these bees show the epithelium with high vacuolization, spherocrystals, cell fragments released to the organ lumen, apocrine secretion, nuclear pyknosis, loss of cell-cell contact, damage to regenerative cell nests, and to the peritrophic matrix. These results indicate that the chitin synthesis-inhibiting insecticide teflubenzuron is toxic to *A. mellifera* after chronic oral exposure at realistic field concentration, although it is classified as non-toxic to adult and non-target insects.

Keywords: Insecticide. Bee. Histopathology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema de exposição de criação e tratamento	15
<b>Figura 2.</b> Análise de sobrevida de Kaplan-Meier	18
<b>Figura 3.</b> Intestino médio. Controle. HE	19
<b>Figura 4.</b> Intestino médio. Tratamento. HE	20
<b>Figura 5.</b> Intestino médio. Mercúrio de bromofenol, PAS e Von Kossa	22
<b>Figura 6.</b> Intestino médio. PAS e Von Kossa	23
<b>Figura 7.</b> Intensidade da marcação histoquímica	.24
<b>Figura 8.</b> Índice de lesão do intestino médio	25

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Análise de regressão de Cox

18

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>10</b>
<b>3. Material e métodos</b>	<b>15</b>
3.1. Insetos	15
3.2. Exposição ao Inseticida	15
3.3. Análise de sobrevivência	16
3.4. Histopatologia	16
3.5. Análises histoquímicas	17
3.6. Índice de lesão	17
3.7. Análises estatísticas	18
<b>4. Resultados</b>	<b>18</b>
4.1. Análise de sobrevivência	18
4.2. Histopatologia	19
4.3. Análises histoquímicas	21
4.4. Índice de Lesão	25
<b>5. Discussão</b>	<b>27</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>29</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>30</b>

## 1. Introdução

Hymenoptera é uma das mais ricas ordens de insetos em número de espécies, com mais de 150 mil descritas, dividida em Symphyta e Apocrita, com 27 superfamílias (nove em Symphyta e 18 em Apocrita) e 132 famílias (Aguiar, 2013), compreendendo animais como vespas parasitóides, vespas, formigas e abelhas que apresentam importância econômica e ecossistêmica atuando como controladores de pragas, na reciclagem de nutrientes, dispersão de sementes e polinização.

Dentre os Hymenoptera, a abelha *Apis mellifera* possui importância médica, econômica e ecológica devido aos produtos gerados nas colmeias, como mel, cera, própolis, pólen, apitoxina e geléia real. O mel, um dos produtos apícolas mais conhecidos, apresenta propriedades terapêuticas devido às suas atividades antimicrobianas, antioxidantes, prebióticas e como protetor de doenças gastrointestinais, além de ser uma boa fonte de energia devido à saturação de açúcares (Silva, 2006). Também a própolis é demonstrada ter propriedades cicatrizante e antibiótica (Bernardo et al., 1990; Barbosa, 2009) e o veneno da abelha, efeitos analgésicos e anti-inflamatórios no tratamento de pessoas portadoras de artrite reumatoide (Silvano, 2020).

Além dos produtos apícolas, essa abelha, como as demais, tem papel como polinizadora de plantas nativas e cultivadas (Michener, 2007; Ballantyne et al., 2017; Hung et al., 2018), atuando no aumento da produtividade de diversas culturas, preservação da flora e produção de sementes florestais (Pinheiro, 2009). Na região Neotropical, grande parte das espécies arbóreas que compõem as florestas tropicais é polinizada por abelhas (Frankie et al., 1990; Bawa, 1990). No Brasil, *A. mellifera* desempenha um importante papel na polinização de cultivares, sendo o principal agente polinizador do café (Amaral, 1972; Fávero et al., 2000), canola (Kotaka et al., 2004), girassol (Moreti, 1989; Morgado e Carvalho, 2000), cebola (Lorenson et al., 1993; Witter e Blochtein, 2003), macadâmia (Paulino e Marchini, 2000) e soja (Fávero e Nogueira-couto, 2000), contribuindo para o aumento da produção, peso e número de sementes dos frutos (Nicodemo e Nogueira-couto, 2002).

Diante do valor ecológico e econômico desempenhado pelas abelhas, um fenômeno que vem preocupando os pesquisadores e agricultores é o Distúrbio do Colapso de Colônias (Colony Collapse Disorder – CCD), percebido inicialmente no inverno de 2006 – 2007 nos Estados Unidos da América que pode ser identificado por três principais características: (1) a rápida perda de abelhas operárias adultas de colônias afetadas, gerando o enfraquecimento ou a morte

da colônia; (2) uma perceptível ausência de abelhas operárias mortas dentro e ao redor das colmeias afetadas; e (3) a invasão tardia de pragas de colmeias e cleptoparasitismo de colônias por abelhas vizinhas (van Engelsdorp et al., 2009). No Brasil, entre 2013 e 2017, foram registradas 17538 perdas de colônias de *A. mellifera*, com uma estimativa de mais de um bilhão de abelhas mortas, causando potenciais reduções na biodiversidade, polinização e danos econômicos, sendo a principal causa possível, a frequente exposição das abelhas aos inseticidas (Castilhos et al., 2019).

Além da CCD, há um declínio na riqueza de espécies de abelhas observadas mundialmente. O número de espécies coletadas pertencentes a diversas famílias, como Melitidae, Andrenidae, Halictidae, Colletidae, Megachilidae e Apidae tem diminuído constantemente desde a década de 1990. Entre 2006 e 2015, foram encontradas 25% menos espécies do que antes de 1990, indicando um declínio mundial na diversidade de abelhas, uma vez que estão se tornando mais raras e menos provável de serem encontradas (Zattara e Aizen, 2021).

Diversos fatores podem estar relacionados ao declínio das abelhas e ao CCD. A deficiência nutricional da colônia afeta as reservas de alimento nas colmeias afetando negativamente o estado nutricional das gerações subsequentes de operárias (Brodschneider e Crailsheim, 2010). De acordo com DeGrandi-Hoffman e Chen (2015), os problemas nutricionais em abelhas afetam o sistema imunológico e estão associados às causas da CCD. Diversos patógenos, parasitas e predadores também estão relacionados às causas do colapso de colônias (Message et al., 2012; Pires et al., 2016). Outro fator importante é o uso de agrotóxicos que até pouco tempo, a intoxicação das abelhas estava associada exclusivamente à exposição letal, resultando em uma alta taxa de indivíduos mortos próximos às colônias (Pires et al., 2016). No entanto, as consequências dos efeitos subletais dos pesticidas às abelhas têm sido, atualmente, alvo de preocupação entre a comunidade científica, pois os mesmos podem alterar o comportamento, o desenvolvimento neurológico e fisiológico e o sistema imunológico destes insetos (Kakamand, 2008; Whitehorn et al., 2012; Catae, 2014; Castro et al., 2020; Serra et al., 2021).

Como *A. mellifera* possui grande capacidade de forrageio, podendo coletar recursos essenciais para a colônia, como pólen, néctar, água e resina, a mais de 9,5 km da colônia (Beekman & Ratnieks, 2000), elas estão passíveis à exposição aos agrotóxicos (Carneiro et al., 2015). As abelhas, em campo, podem ser expostas aos agrotóxicos diretamente, através da exposição às gotículas em suspensão no ar, inalação de pesticidas voláteis durante ou após a

pulverização nas culturas (Anastassiades et al., 2003; Sanchez-bayo & Goka, 2014; Simon-delso. et al. 2014); ou indiretamente, através da ingestão de grãos de pólen, néctar, mel e água contaminados (Sanchez-bayo & Goka, 2014; Blacquiere, 2012; Stoner, 2012).

Abelhas expostas às doses subletais de inseticidas apresentam dificuldades de retorno à colônia, no comportamento de forrageio, na polinização (Bortolli et al., 2003), deficiência no aprendizado olfatório (Decourtye et al., 2004), distúrbios de coordenação motora, incapacidade de voo, tremores e morte (Carvalho et al., 2009) e deficiências na aprendizagem, memória e dificuldades de locomoção (Souza, 2009; Lambim et al., 2001). Devido à atividade externa das abelhas campeiras, elas estão mais susceptíveis à contaminação, prejudicando sua capacidade de aprendizagem e orientação, o que pode ser um risco para o funcionamento da colônia (Nocelli et al., 2012).

Além dos efeitos comportamentais, os agrotóxicos podem causar danos histopatológicos e citológicos. O cérebro de operárias de abelhas expostas aos lambda-cialotrina e fipronil apresenta evidente neurodegeneração nos corpos celulares dos neurônios e na neurópila, caracterizados por danos mitocondriais, intensa vacuolização e largos espaços intracelulares, além de alterações comportamentais (Castro et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2021a). Outros órgãos como glândulas mandibulares e glândulas hipofaríngeas também tem suas funções comprometidas, quando expostas ao lambda-cialotrina, deltametrina, malathion e tiametoxam, evidenciadas por alterações na arquitetura do epitélio, dilatação do retículo endoplasmático rugoso, aumento de vacúolos, vesículas secretoras com conteúdo heterogêneo e autolisossomos, sugerindo processo de morte celular mediada por necrose nesses órgãos (Kakamand, 2008; Castro et al., 2020). Abelhas expostas ao inseticida de ação neurotóxica, tiametoxam e ao fungo *Strobilurin*, apresentam danos nos túbulos de Malpighi, como degeneração do labirinto basal, aumento da quantidade de retículo endoplasmático liso no citoplasma, perda e alteração de organelas citoplasmáticas (Catae et al., 2014; Batista et al., 2020; Farder-Gomes et al., 2022). No intestino médio, a exposição a pesticidas neurotóxicos, como imidacloprido, fipronil, tiametoxam, lambda-cialotrina; e, ao inibidor da biossíntese de lipídios spiromesifen, aumenta a vacuolização citoplasmática, espaços intercelulares, desorganização da borda estriada e picnose nuclear, apresentando mitocôndrias danificadas, autofagossomo, degeneração do epitélio intestinal, provocando intensa síntese de matriz peritrófica, aparecimento de protrusões apicais com fragmentos de células liberadas no lúmen do órgão (Jesus et al., 2007; Cruz et al., 2009; Catae et al., 2014; Bastista, 2020; Serra et al., 2021; Farder-Gomes et al., 2021b, Carneiro et al., 2022).

Dentre os inseticidas, os inibidores de crescimento (IDCs) afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento larval dos insetos (Tunaz & Uygun, 2004), devido às alterações fisiológicas e bioquímicas nas vias metabólicas (Dhadialla et al., 2005). Os IDCs são classificados como “inseticidas análogos ao hormônio juvenil e ecdisteróides” ou em “inibidores de biossíntese de quitina (IBQ)” (Tunaz & Uygun, 2004).

O teflubenzurom é um inseticida fisiológico, do grupo benzoiluréia, que age inibindo a síntese de quitina, um dos principais componentes do tegumento do inseto na formação do exoesqueleto. É um defensivo versátil, podendo ser usado para combater pragas de diversas espécies cultivadas como café, canola, girassol e soja, das quais *A. mellifera* é a principal polinizadora (D’avila, 2005).

Em *A. mellifera*, tratamentos com teflubenzurom administrados oral e topicamente afetam o desenvolvimento de larvas recém-eclodidas (Gromiz & Gromiz, 1996). Em abelhas do gênero *Bombus*, o teflubenzurom tem efeitos negativos na reprodução, eclosão de ovos e sobrevivência de larvas (Mommaerts, 2006). O teflubenzurom também afeta a emergência de adultos e influencia negativamente diferentes aspectos comportamentais e morte dos adultos da abelha *Osmia rufa* (Ferrazi, 2003).

Análises de cromatografia detectaram resíduos de teflubenzurom em grãos de pólen com concentrações entre 5 e 50 µg/kg em cerca de 40 apiários em diferentes regiões da Espanha (Vázquez et al., 2015). Outro inseticida inibidor da síntese de quitina, o diflubenzurom, cujo modo de ação é semelhante ao teflubenzurom (Matsumura, 2010), foi registrado em grãos de pólen pelo mundo (Tong, 2018; Moreno-González et al., 2020; Friedle, 2021), o que pode indicar que esses agrotóxicos podem ter efeitos subletais em abelhas que se alimentam dessa fonte de proteínas.

O trato digestivo dos insetos é formado por uma camada de células epiteliais sobre uma membrana basal (Snodgrass, 1993). É dividido em três regiões principais de origens ontogenéticas diferentes, sendo que os intestinos anterior e o intestino posterior de origem ectodérmica, enquanto o intestino médio é de origem endodérmica (Snodgrass, 1993; Beutel et al., 2013).

O intestino médio dos insetos é a porta de entrada de nutrientes e compostos químicos exógenos devido à sua função absorptiva. Moléculas inseticidas podem chegar à hemolinfa do inseto através do epitélio do intestino médio por diversas rotas. Moléculas pequenas, inferiores a 1000 Da, como o teflubenzurom, são capazes de se difundirem através da membrana plasmática e citosol até a hemolinfa. Em outros casos, essas moléculas requerem proteínas

transportadoras transmembrana para serem translocadas. Moléculas maiores, como proteínas e RNAi podem atravessar o epitélio intestinal mediadas por transportadores transmembrana ou vesículas endocíticas (Deneke et al., 2018).

Em *A. mellifera*, o intestino médio é caracterizado por um epitélio simples, com células colunares digestivas com microvilosidades na superfície apical e núcleo esférico, sendo a principal seção do trato digestório com função de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes e o lúmen é revestido por camadas acelulares semipermeáveis que formam a matriz peritrófica, sendo mais espessa na região posterior em relação à anterior do intestino médio (Oliveira et al., 2019; Castro et al., 2020; Serra et al., 2021; Carneiro et al., 2022). A matriz peritrófica é composta por fibrilas de quitina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteínas, sintetizadas pelas células do intestino médio (Hegedus et al., 2009; Liu et al., 2019) com função de proteger o epitélio contra abrasão mecânica (Hegedus et al., 2009), prevenção de infecções por microorganismos (Lahane, 1997; Kuraishi et al., 2011; Sadlova et al., 2018; Erlandson et al., 2019; Oliveira et al., 2022), toxinas e outras substâncias danosas (Guo et al., 2019), além de promover o aumento da eficiência da digestão (Bolognesi, 2008).

A matriz peritrófica pode ser secretada em sucessivas camadas concêntricas pelas células do epitélio ao longo de todo o intestino, podendo ser classificada como “Tipo I” ou secretada pela cardia, um tecido especializado na região mais anterior do intestino médio, denominada “Tipo II”, mas exclusivamente em Diptera (Hegedus et al., 2009). Em abelhas, testes de imunolocalização da proteína peritrofina-55, sugerem que a matriz peritrófica tem origem nas células epiteliais ao longo de todo intestino médio, podendo ser classificadas como Tipo I (Marques-Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2015). Sua deposição pode ser contínua ou em resposta a estímulos alimentares, resultando em uma arquitetura com multicamadas em diferentes espécies de abelhas (Teixeira et al., 2019).

A composição de quitina e proteínas na matriz peritrófica desempenha um papel central na correta funcionalidade e permeabilidade, pois essa estrutura age como um filtro retendo partículas de alimentos não digeridos, microorganismos e toxinas no espaço endoperitrófico, além de gerir a troca e reabsorção de enzimas digestivas (Martin et al., 2006). Inseticidas, como os inibidores de biossíntese de quitina, podem causar danos estruturais na matriz peritrófica, afetando sua integridade e alterando a permeabilidade (Merzendorfer et al., 2012; Kelkenberg et al., 2015).

Em vista do modo de ação do teflubenzurom como inseticida inibidor da síntese de quitina e sua baixa toxicidade para insetos adultos e não-alvos, como descrito na literatura e

bula do fabricante, é necessário avaliar se abelhas recém-emergidas expostas cronicamente ao teflubenzurom em concentração de campo, apresentam algum nível de toxicidade ou mortalidade devido a possíveis danos histopatológicos e estruturais no intestino médio. A hipótese é que a toxicidade ou mortalidade seja resultado de danos à matriz peritrófica devido sua composição de quitina, causando danos ao epitélio intestinal.

## **2. Objetivo**

Verificar se o inseticida teflubenzurom tem efeitos tóxicos e histopatológicos no intestino médio de operárias adultas da abelha *A. mellifera*.

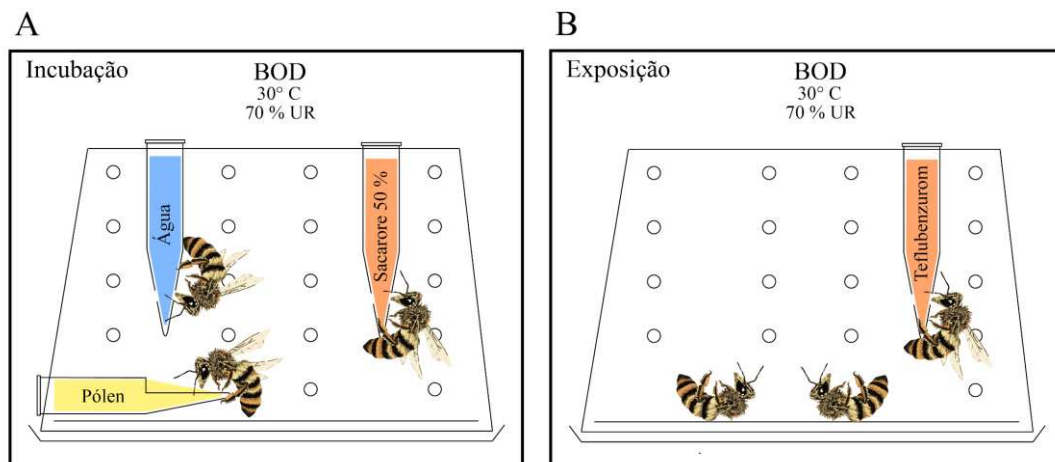
## **3. Material e métodos**

### **3.1. Insetos**

Para obtenção de abelhas recém-emergidas, três quadros com pupas de *A. mellifera* foram coletados de três diferentes colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'N; 42°52'O) e mantidas por 24 h a 30 °C ± 2 °C e 70% de umidade relativa até a emergência dos adultos (Williams et al., 2013). As abelhas recém-emergidas foram alocadas em 20 potes plásticos de 250 mL com 13 abelhas por pote e alimentadas com solução de sacarose a 50 %, pólen e água *ad libitum* (Fig. 1A) por 72 horas.

### **3.2. Exposição ao Inseticida**

As operárias com 72 h após a emergência foram tratadas com teflubenzurom Nomolt® na dose de campo de 150 g/L recomendada pelo fabricante diluída em solução de sacarose a 50%. O alimento foi ofertado em microtubos de 1,5 mL para 13 abelhas mantidas em gaiolas de 250 mL (Fig. 1B; Williams et al., 2013). No tratamento controle, as operárias foram alimentadas apenas com solução de sacarose a 50%.



**Figura 1.** Esquema de exposição de criação e tratamento de *A. mellifera*. [A]: Período de incubação. Operárias recém-emergidas alimentadas com água, pólen e solução de sacarose a 50% por 72 horas. [B]: Exposição ao inseticida. Operárias com 72 h de idade alimentadas com solução de sacarose 50% contendo 150 g/L teflubenzurom. O controle foi alimentado apenas com solução de sacarose 50%.

### 3.3. Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência foi realizada em 130 abelhas, com cinco repetições para o grupo controle ( $n = 65$ ) e cinco para tratamento com teflubenzurom ( $n = 65$ ). A mortalidade foi registrada após 12h e depois a cada 24 horas até completar oito dias de exposição crônica. As abelhas mortas foram retiradas e descartadas. Os alimentadores foram verificados diariamente, e o alimento repostado quando necessário. A dieta para as abelhas foi preparada a cada três dias, evitando a contaminação por fungos das soluções de sacarose nos alimentadores.

### 3.4. Histopatologia

Cinco operárias do tratamento e do controle foram coletadas e dissecadas após oito dias de exposição. As abelhas foram crioplanadas a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, dissecadas em NaCl 125 mM e os intestinos médios transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina Leica. Cortes com 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos com

navalha de vidro em micrótomo rotativo, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscópio de luz Olympus BX60.

### 3.5. Análises histoquímicas

Algumas secções do intestino médio de *A. mellifera* foram submetidas às técnicas histoquímicas de ácido periódico-Schiff (PAS) para evidenciar carboidratos na borda estriada do epitélio digestivo e na matriz peritrófica, Von Kossa para identificação de esferocristais e mercúrio de bromofenol para proteínas totais de acordo com Bancroft e Gamble (2008). Dez imagens por grupo experimental foram obtidas com fotomicroscópio Olympus BX53 com objetiva de 40X e abertura numérica de 0.75 para quantificação de esferocristais e da intensidade da marcação de PAS e mercúrio de bromofenol utilizando o software ImageJ/FIJI. A intensidade da reação positiva para PAS e mercúrio de bromofenol foi medida através da análise da intensidade dos valores de cinza das imagens (Urstadt, 2022). As imagens tiveram seus valores de pixel convertidos da escala de cores RGB para escala de cinza. Áreas de 32 x 32 pixels foram utilizadas para avaliar os valores de intensidade pixel em cinco regiões escolhidas aleatoriamente. Desses dados foi extraída a média dos valores de intensidade obtidos por imagem.

### 3.6. Índice de lesão

Dez secções histológicas por intestino médio de cada operária foram selecionados aleatoriamente e fotografados em microscópio de luz com objetiva 40x, abertura numérica 0,75 para avaliação do índice de lesão de órgãos (Bernet et al., 1999; Grella, 2019) causada pelo teflubenzurom após exposição oral. Para avaliação da matriz peritrófica, dez imagens apenas do lúmen foram obtidas para cada intestino. A soma de todas as alterações histopatológicas 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 grau de lesão. As pontuações (a) das alterações foram classificadas como: i) sem ocorrência = 0; ii) ocorrência leve = 2; iii) ocorrência moderada = 4 ou iv) ocorrência grave = 6. O grau de lesão (w) foi classificado como: i) dano reversível (fragmentos celulares liberados para o lúmen intestinal, secreção apócrina, esferocristais e danos na matriz peritrófica) = 1; ii) dano geralmente reversível (vacuolização do citoplasma celular e alterações na borda estriada) = 2,

e ii) dano irreversível (picnose nuclear, perda do contato celular e danos nas células regenerativas) = 3.

### 3.7. Análises estatísticas

Para a análise de sobrevivência, o método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a sobrevivência. A análise de regressão de Cox foi utilizada para estimar a probabilidade de sobrevivência do grupo controle em relação ao tratado.

Para as análises histoquímicas, foram feitos, para cada parâmetro analisado, teste de Shapiro-Wilk para normalidade, Levene para a homogeneidade da amostra. Teste t-Welch foi utilizado para a avaliação da marcação por mercúrio de bromofenol e t-Student para a comparação das intensidades de marcação para PAS.

Para o índice de lesão, foram feitos, para cada parâmetro analisado, teste de Shapiro-Wilk para normalidade, Levene para a homogeneidade da amostra e teste t-Student para avaliar divergências significativas nas alterações histopatológicas analisadas. Todos os testes foram realizados utilizando o software Jamovi 2.3.18 com nível de significância de 5%.

## 4. Resultados

### 4.1. Análise de sobrevivência

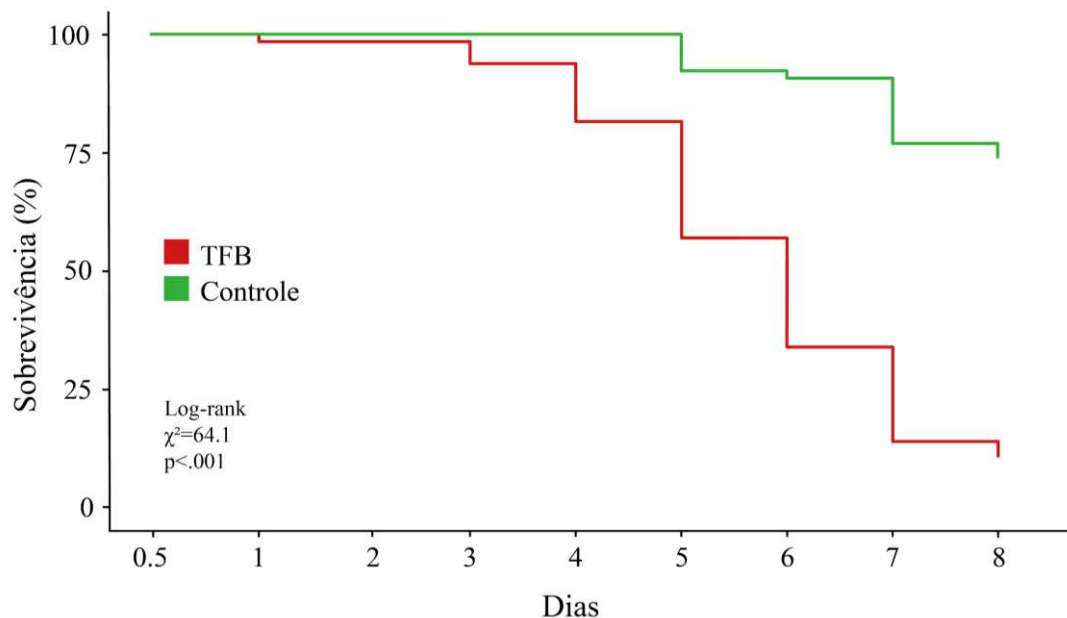
As operárias de *A. mellifera* expostas oralmente ao teflubenzurom por oito dias tiveram alta mortalidade, apresentando 13% de probabilidade de sobrevivência em relação ao grupo controle (HR = 0.13) (Tabela 1).

O teflubenzurom afetou significativamente a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* após oito dias de exposição oral, reduzindo de 100% no controle para 10,7% com teflubenzurom (test long-rank,  $\chi^2 = 64,1$ ; gl = 1;  $p < 0,01$ ; Figura 2).

**Tabela 1.** Análise de regressão de Cox. A razão de risco (HR) de mortalidade para o grupo controle é de 0.13, indicando que o grupo possui 87% de probabilidade de sobrevivência em relação ao grupo tratado. Intervalo de confiança de 95%.

Regressão de Cox	Número amostral	HR	Valor $p$
Tratamento	65 (100.0)	0.87	-
Controle	65 (100.0)	0.13	$p < 0.001$

HR = Risco relativo

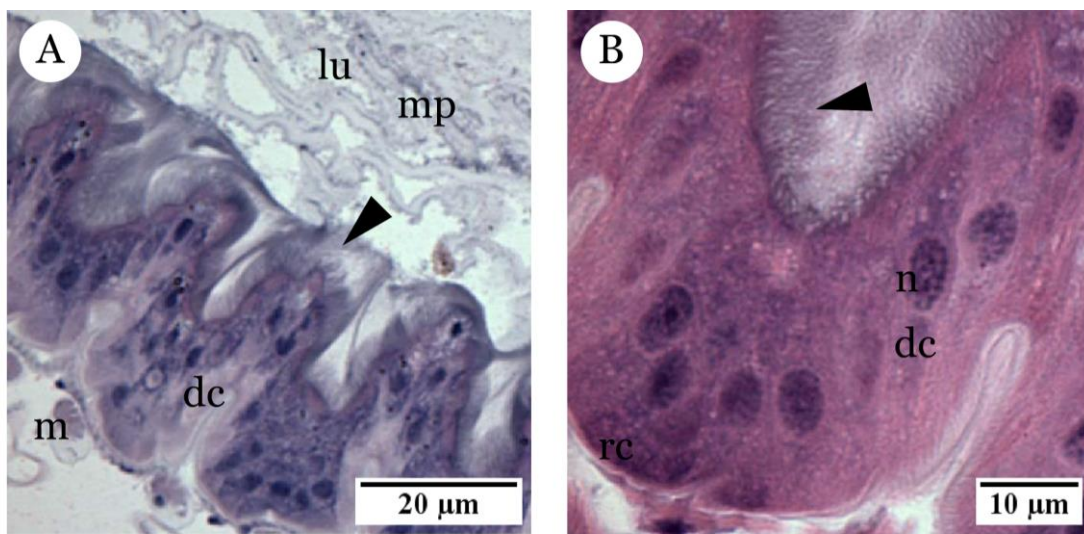


**Figura 2.** Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. Mortalidade de abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas expostas oralmente a solução sacarose 50% e 150 g/L teflubenzurom por oito dias (log-rank = 64.1,  $p < 0.001$ ).

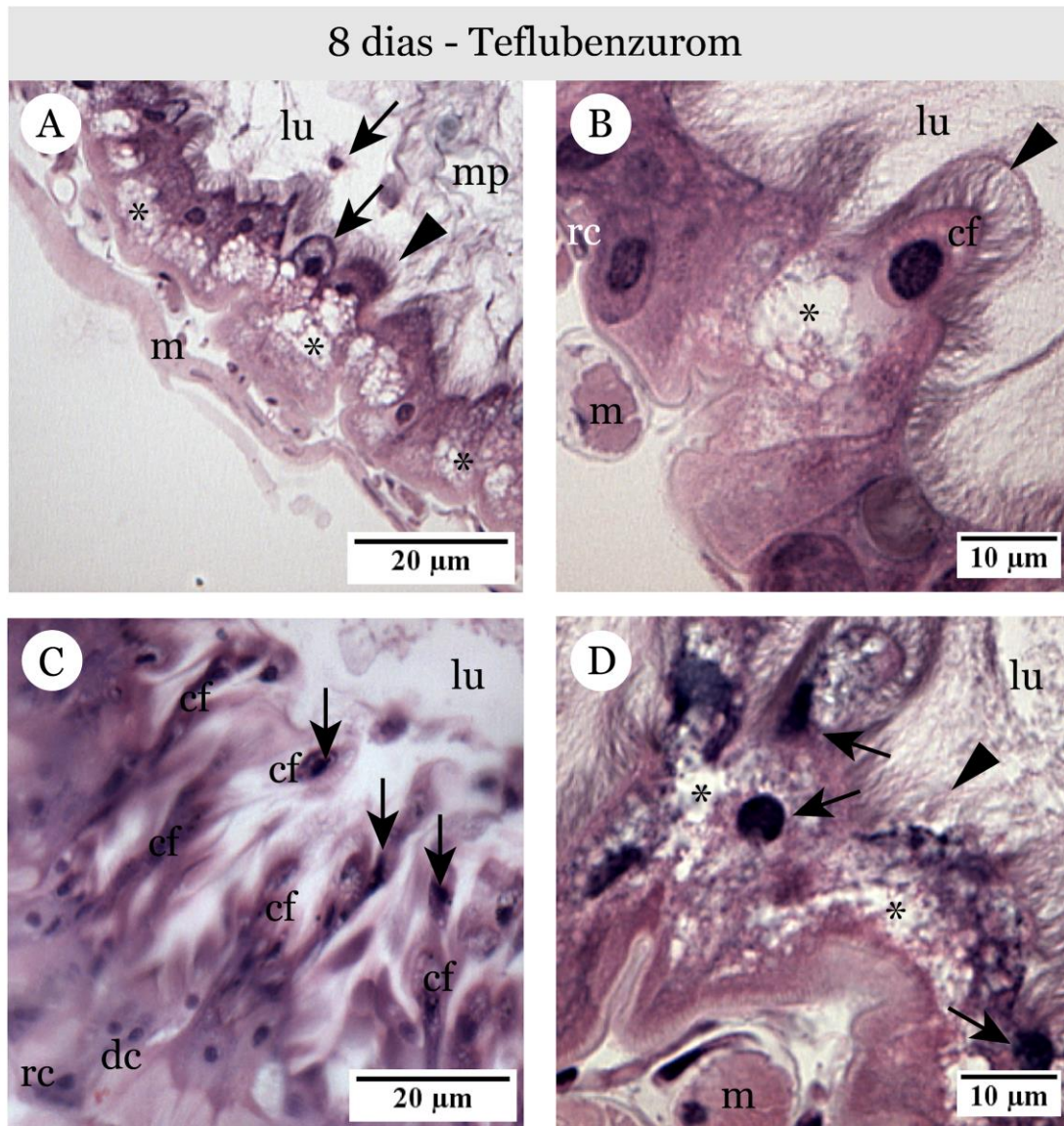
#### 4.2. Histopatologia

Abelhas do grupo controle, alimentadas com solução de sacarose por oito dias apresentaram o epitélio do intestino médio com células digestivas colunares, borda estriada bem desenvolvida e uniforme e com núcleo com cromatina descondensada e ninho de células regenerativas na porção basal (Fig. 3 A e 3 B). No lúmen ocorrem diversas camadas de matriz peritrófica (Fig. 3 A).

As operárias de *A. mellifera* alimentadas com teflubenzurom apresentaram o epitélio do intestino médio com características histopatológicas. Nessas abelhas ocorreu desorganização do epitélio com perda dos ninhos de células regenerativas, células digestivas com citoplasma rico em vacúolos, picnose nuclear e rompimento do contato entre as células formando espaços intercelulares dilatados (Fig. 4 A-D). O rompimento do epitélio se torna evidente com a liberação de células no lúmen e a escassez de células regenerativas para repor os danos (Fig. 4 B). A matriz peritrófica dessas operárias apresentou aspecto difuso e com poucas camadas (Fig. 4 A).



**Figura 3.** Micrografias de luz do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com solução de sacarose 50% (controle). [A-B]: Epitélio saudável, mostrando células digestivas (dc), núcleo com cromatina descondensada (n), ninho de células regenerativas (rc), borda estriada homogênea (cabeça de seta) e lúmen (lu) com produção normal de matriz peritrófica (mp). Hematoxilina e eosina.



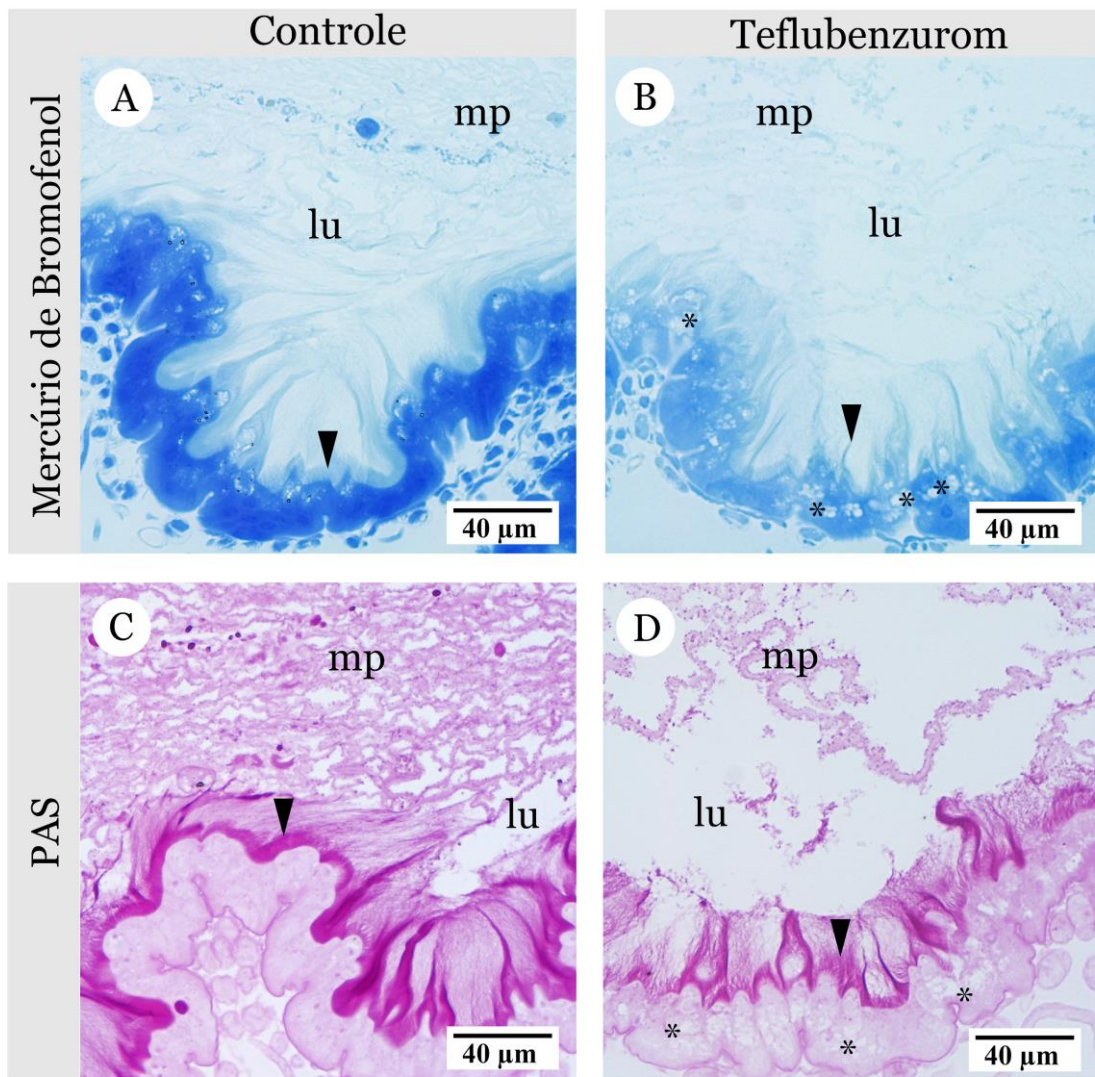
**Figura 4.** Micrografias de luz do intestino médio de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com solução de teflubenzurom dissecadas após oito dias de exposição. [A-D]: Epitélio altamente danificado, evidenciando o rompimento do contato celular (asterisco), picnose nuclear (seta), desorganização da borda estriada (ponta de seta) e fragmento celular (cf) com núcleos picnóticos, escapando para o lúmen (lu). Hematoxilina e eosina.

#### 4.3. Análises histoquímicas

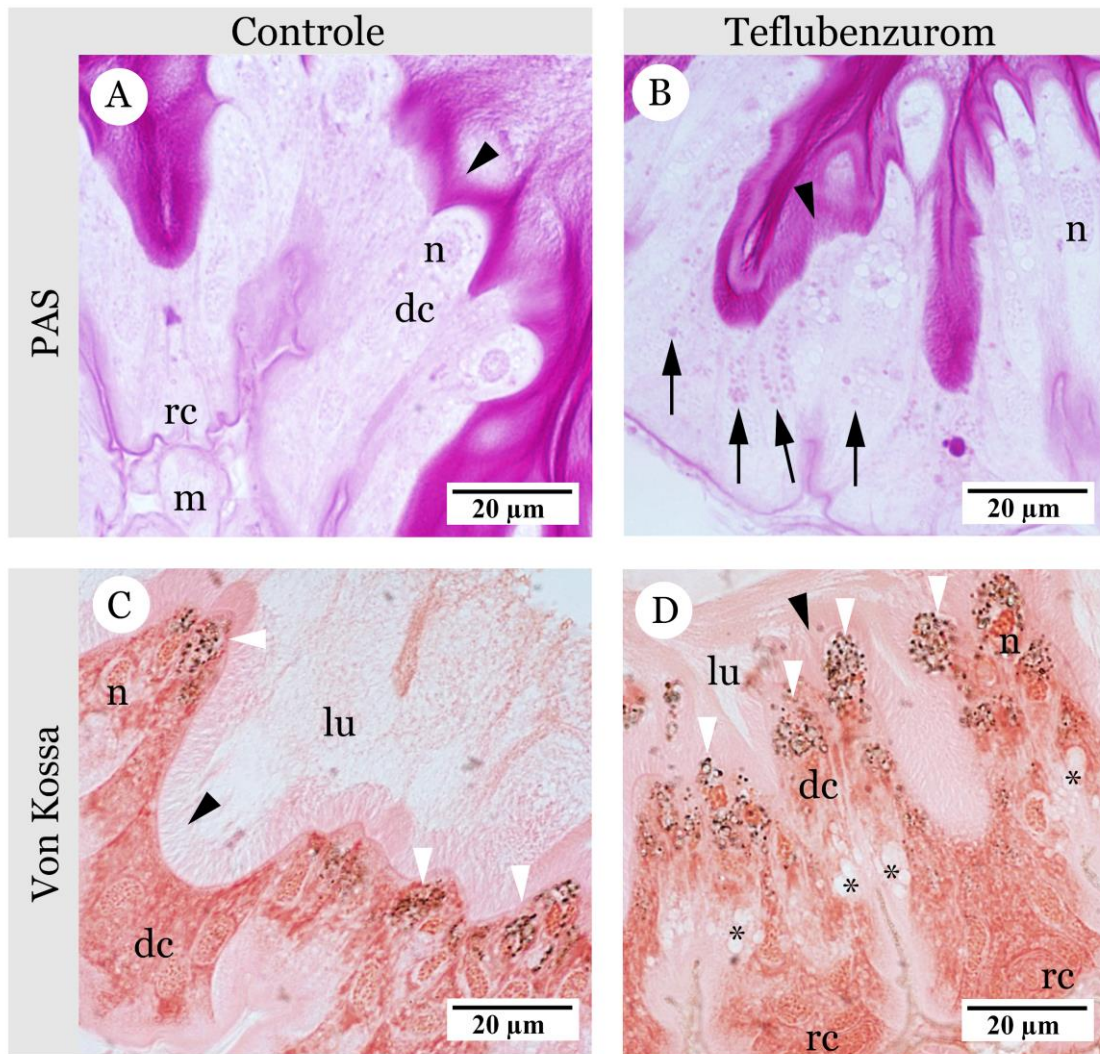
Nas abelhas tratadas com o inseticida a intensidade da reação por mercúrio de bromofenol para proteínas foi menor (teste t-Welch = 16.5, gl = 29.2,  $p < .001$ ) no epitélio do intestino médio (Fig. 5 A, B) e na matriz peritrófica que no controle (Fig. 7 A).

A histoquímica por ácido periódico-Schiff para evidenciar polissacarídeos neutros, glicoconjugados e carboidratos revelou diferenças na intensidade da reação entre abelhas alimentadas com teflubenzurom e controle ( $t$ -Student = 6.53,  $gl = 22.0$ ,  $p = 0.001$ ); sendo menor no tratamento (Fig. 5 C, 5 D). A técnica também revelou maiores concentrações de esferocristais presentes nas células digestivas do epitélio das abelhas tratadas em relação ao controle (Fig. 6 A, 6 B). A Matriz peritrófica das abelhas tratadas com inseticida mostrou reação PAS-positiva menos intensa que o grupo controle (Fig 7 B).

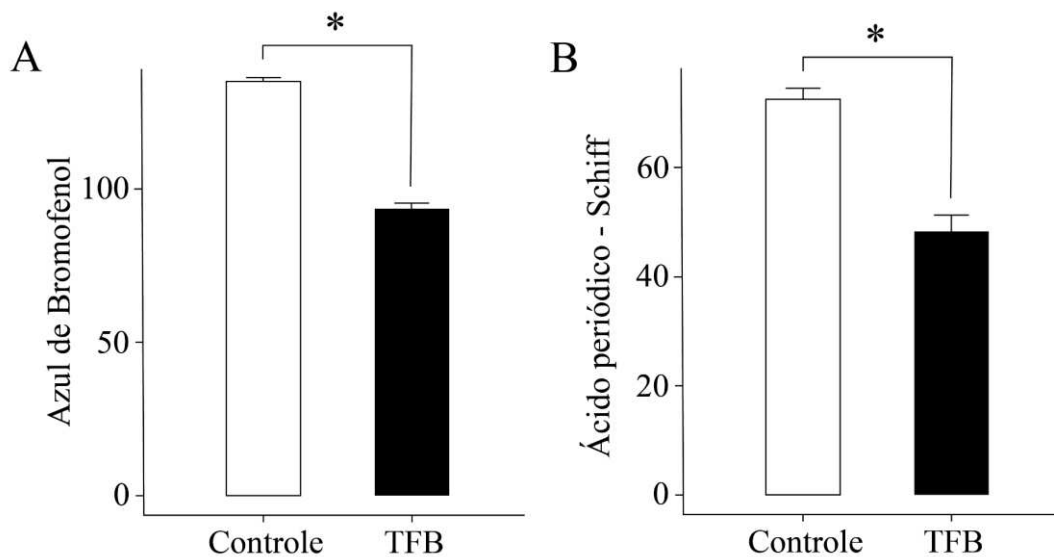
O teste de Von Kossa para identificar cristais de cálcio revelou maior concentração do mineral em esferocristais maduros na porção apical das células digestivas e em fragmentos celulares nos intestinos de abelhas alimentadas com solução de teflubenzurom em comparação com o grupo controle (Fig. 6 C, 6 D).



**Figura 5.** Micrografia de luz do intestino médio de *A. mellifera* submetidas às técnicas de mercúrio de bromofenol, PAS e Von Kossa. [A e B]: Coloração por mercúrio de bromofenol. O epitélio e a matriz peritrófica do grupo controle (A) apresenta coloração mais intensa que a do grupo tratado (B) indicando maior concentração proteica. [C-F]: Coloração por PAS. [C]: Controle evidenciando lúmen (lu) com matriz peritrófica (mp). [D]: Abelhas tratadas com inseticida apresentaram reação positiva menos intensa para carboidratos e glicoconjugados na matriz peritrófica (mp) em comparação com o grupo controle. Note a matriz peritrófica difusa e pouco organizada. Asterisco = Perda do contato celular, ponta de seta = borda estriada.



**Figura 6.** Micrografia de luz do intestino médio de *A. mellifera* submetidas às técnicas de PAS e Von Kossa. [A]: Detalhe do epitélio de abelhas do grupo controle sem esferocristais imaturos evidentes pela marcação de PAS. [B]: Epitélio de abelhas alimentadas com inseticida contendo esferocristais imaturos (seta) marcados por PAS. [C e D]: Coloração pela técnica de Von Kossa evidenciando esferocristais maduros com cálcio (ponta de seta branca). O aumento de inclusões cálcio-positivas no grupo tratado em relação ao controle pode ser observado em (D). lu = lúmen, n = núcleo, rc = ninho de células regenerativas, m = camada muscular. Asterisco = Perda do contato celular, ponta de seta preta = borda estriada.



**Figura 7.** Intensidade da marcação histoquímica. [A]: Intensidade da marcação positiva pela técnica histoquímica do azul de bromofenol no intestino médio de *A. mellifera* após exposição ao inseticida teflubenzurom. A redução da intensidade da marcação de proteínas totais pode ser observada no grupo TFB. [B]: Intensidade da marcação positiva para a reação histoquímica do ácido periódico-Schiff no intestino médio de *A. mellifera* após exposição ao inseticida teflubenzurom (TFB). A redução na intensidade da marcação de polissacarídeos e glicoconjugados neutros pode ser observada no grupo tratado (TFB). Os asteriscos indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado.

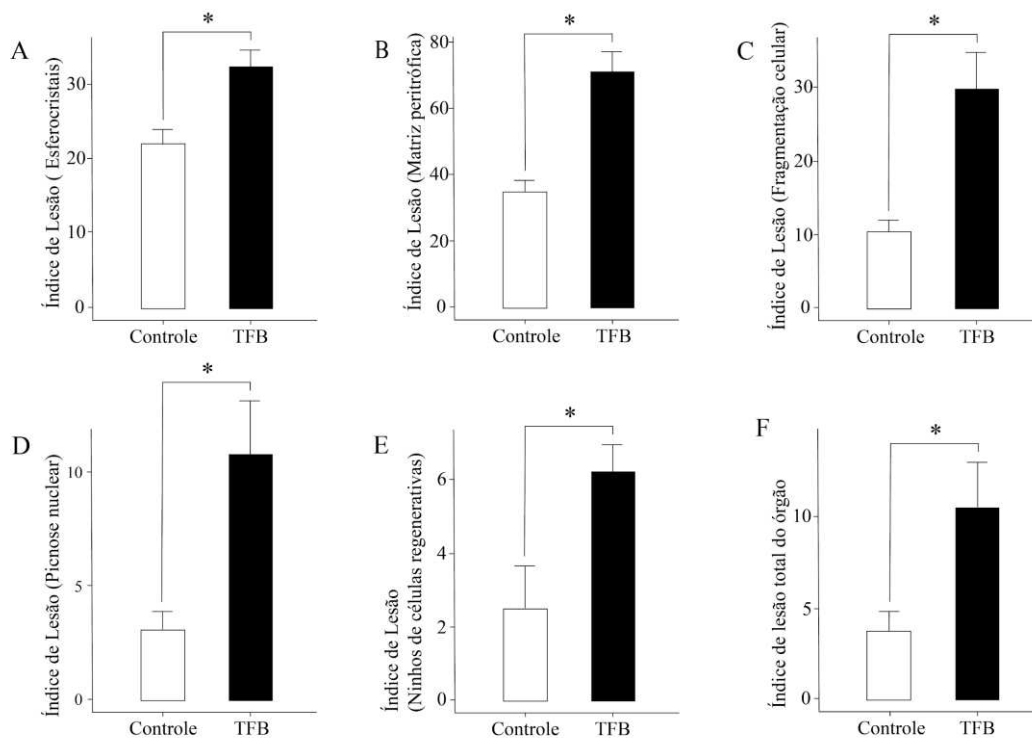
#### 4.4. Índice de Lesão

O índice de lesão do intestino médio foi estabelecido para quantificar as diferentes alterações observadas na histologia do órgão exposto à solução de teflubenzurom em relação ao grupo controle.

Não houve alterações significativas nos parâmetros de grau de lesão, incluindo vacuolização ( $t$ -Welch = 0.673,  $gl$  = 4.54,  $p > 0.05$ ) e alterações da borda estriada ( $t$ -Student = 0.545,  $gl$  = 6.00,  $p > 0.05$ ). O acúmulo de esferocristais (grau de lesão: 1) observado na histologia foi confirmado com o índice de lesão (Fig. 8 A), mostrando maior valor nas abelhas tratadas com teflubenzurom que naquelas do controle ( $t$  de Student = -3.52,  $gl$  = 54.0,  $p < 0.05$ ). As operárias tratadas também mostraram maior índice de lesão 1 que no controle ( $t$  de Student = -5.41,  $gl$  = 8.00,  $p < 0.001$ ) correspondentes aos danos na produção de matriz peritrófica (Fig. 8 B) e ao aumento de fragmentação celular nas células digestivas (Fig. 8 C).

Alterações histopatológicas de grau 3 foram mais evidentes no grupo tratado com o inseticida teflubenzurom com aumento de células apresentando picnose nuclear (t-Student = -3.06, gl = 6.00, p = 0.022), e danos ou perda de ninhos de células regenerativas (t-Student = -2.67, gl = 6.00, p = 0.037; Fig. 8 D, 8 E).

No geral, o índice total de lesão do intestino médio foi maior nas operárias de *A. mellifera* expostas oralmente ao inseticida inibidor da síntese de quitina, teflubenzurom (t-Welch = -2.47, gl = 9.60, p = 0.034; Fig. 8 F).



**Figura 8.** Índice de lesão do intestino médio de operárias de *A. mellifera* expostas por oito dias à solução de sacarose 50% (controle) e teflubenzuron 150 g/L (TFB). [A]: Porcentagem de esferocristais em função da área celular. [B]: Porcentagem de lúmen visível em relação à matriz peritrófica. [C]: Porcentagem de fragmentação celular escapando para o lúmen do órgão em relação ao número total de células. [D]: Porcentagem de células em picnose nuclear em função do total de células analisadas. [E]: Dano ou ausência de ninhos de células regenerativas. [F]: índice de lesão total do órgão. Os asteriscos indicam diferença estatística (t de Welch = -2.47, gl = 9.60, p < 0,05) entre os grupos controle e tratado.

## 5. Discussão

Os resultados indicam que o teflubenzurom apresenta toxicidade e letalidade para abelhas adultas *A. mellifera*. A exposição crônica por oito dias mostra diferenças significativas na sobrevivência, o que pode ser um reflexo de sobrecarga no sistema de detoxificação ao inseticida. As células digestivas do intestino médio das abelhas são dotadas de mecanismos moleculares de detoxificação de compostos xenobióticos, no qual as carboxil/colinesterases, citocromo P450 monooxigenases e glutatona-s-transferases são as principais famílias enzimáticas envolvidas no metabolismo de pesticidas (Claudianos, 2006; Xu, 2013; Wu, 2016). Assim, é plausível sugerir que esses mecanismos não são suficientes para evitar toxicidade em condições prolongadas de exposição ao teflubenzurom, como pode ocorrer em condições de campo quando as operárias forrageiras coletam grãos de pólen contaminados com o inseticida e os armazenam na colônia para alimentação de larvas e operárias jovens.

As análises histopatológicas em conjunto com dados semi-quantitativos obtidos pelo índice de lesão do intestino médio revelam diversos danos celulares entre as abelhas alimentadas com a solução de teflubenzuron, como acúmulo de esferocristais, fragmentos celulares, picnose nuclear, perda do contato celular e liberação de fragmento das células digestivas para o lúmen, perda de células regenerativas e danos e produção irregular da matriz peritrófica.

A presença de esferocristais em maior frequência no grupo tratado, evidenciada pelo teste histoquímico de von Kossa por impregnação argêntica, pode ser um indicativo de possível mecanismo de desintoxicação celular, uma vez que estas estruturas celulares estão relacionados com o controle osmótico (Serrão e Cruz-Landim, 1997; Pinheiro et al., 2008; Lipovsek et al., 2002, 2012) assim como à uma resposta direta ao mecanismo de ação do teflubenzurom. Esferocristais são concreções compostas por lamelas de peptidoglicanos no qual estratos minerais de espessuras variadas se agregam sucessivamente como camadas concêntricas aprisionando  $\text{Ca}^{+2}$  presentes no citoplasma (Ballan-Dufranc, 2002). Inseticidas inibidores da biossíntese de quitina, da família benzoilureia, parecem agir no receptor de sulfoniluréia (SUR) na membrana de vesículas intracelulares responsáveis pela síntese de pequenos filamentos de quitina, ainda durante o processo de exocitose, sendo o SUR um canal de potássio regulando a concentração de cálcio citossólico. Os benzoilureias, provavelmente causam uma rápida modificação do canal SUR, cessando a entrada de potássio, o que resulta na despolarização da membrana vesicular e o aumento da concentração de cálcio no citoplasma (Nasonkin, 1999;

Matsumura, 2010). Os níveis mais elevados de esferocristais no ápice das células colunares e no lúmen do intestino médio de *A. mellifera* tratadas com teflubenzurom pode indicar uma resposta direta do organismo à intoxicação pelo inseticida, capturando e eliminando o excesso de cálcio no citoplasma.

O comprometimento da produção de matriz peritrófica no intestino médio de *A. mellifera* exposta ao teflubenzurom, caracterizada pelo aspecto difuso e poucas camadas também pode estar associada com a inibição do canal SUR, o que inviabiliza a exocitose das vesículas carreadoras dos monômeros de N-acetilglicosaminas para a incorporação nos polímeros de quitina, comprometendo a síntese da matriz peritrófica. A matriz peritrófica em *A. mellifera* é composta por polímeros de quitina, proteínas, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, secretadas em sucessivas camadas concêntricas pelas células do epitélio ao longo de todo o intestino (Liu et al., 2019). Ela assume um papel crucial na proteção do epitélio contra a abrasão mecânica (Hegedus et al., 2009) e prevenção de infecções por microorganismos e toxinas (Guo et al., 2019, Oliveira et al., 2022). A produção anormal da matriz peritrófica ocasionada pelo teflubenzurom pode aumentar os riscos de infecções por microorganismos e patógenos, um dos causadores da CCD (Sánchez-Bayo, 2016), e causar danos abrasivos e por ligações inespecíficas no epitélio (Bolognesi et al., 2008) comprometendo a fisiologia intestinal e a absorção de nutrientes. Portanto, danos no epitélio, causados pelo inseticida, são decorrentes da produção irregular de matriz peritrófica. As análises histoquímicas de intensidade da reação PAS-positiva para polissacarídeos e glicoconjugados neutros revelam diferenças na produção e incorporação de componentes polissacarídicos importantes para a homeostase da matriz peritrófica. Os intestinos das abelhas tratadas com teflubenzurom tiveram reação positiva menos intensa PAS em relação ao controle. A análise quantitativa para a matriz peritrófica também revela menos matriz no grupo tratado. A inibição da incorporação dos polímeros de quitina à matriz, efeito principal do teflubenzurom, provavelmente afeta a produção e organização das camadas da matriz peritrófica, comprometendo sua homeostase e contribuindo para acentuar os danos ao epitélio.

O aumento dos níveis de fragmentação celular no epitélio do intestino médio das abelhas alimentadas com teflubenzurom pode representar um mecanismo de desintoxicação através da eliminação de moléculas tóxicas, derivadas do metabolismo do inseticida, para o lúmen do órgão (Malaspina & Zacarin, 2006). A observação de células em picnose nuclear indica a possibilidade do mecanismo de desintoxicação, pois esta é uma etapa no processo de morte celular programada, na qual há a condensação da cromatina nuclear (Donan & Cotter, 2008). A

eliminação de células do intestino médio, em abelhas saudáveis, é uma estratégia natural para a manutenção do epitélio, na qual células digestivas danificadas pelos estresses químicos e físicos do processo de digestão, são eliminadas para o lúmen do órgão, sendo substituídas por novas células digestivas a partir da diferenciação de células regenerativas presentes em ninhos na região basal do epitélio (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996).

O intestino médio das abelhas alimentadas com o inseticida por oito dias apresenta regiões do epitélio sem ninhos de células regenerativas, o que pode ser devido à diferenciação das células regenerativas em células digestivas para renovar o epitélio como resposta ao aumento dos fragmentos celulares liberados no lúmen intestinal e células em processo de morte. Com o aumento de fragmentação celular e outros danos teciduais, é possível que as células regenerativas no intestino das abelhas alimentadas com o inseticida tenham se diferenciado em uma taxa mais elevada do que os ninhos de células regenerativas das abelhas do grupo controle. Uma vez que as células regenerativas existem em um número limitado no intestino de insetos adultos (Caccia et al., 2019) e em abelhas parecem não proliferarem (Cruz-Landim et al., 1996, França et al., 2006), seu esgotamento em determinadas áreas é condizente com a crescente perda das células digestivas.

O índice de lesão permite avaliar semi-quantitativamente alterações histopatológicas causadas por xenobióticos em tecidos animais (Bernet et al., 1999; Grella, 2019). Sua aplicabilidade neste estudo revela que a concentração de campo de teflubenzurom administrado por oito dias na dieta de abelhas resulta em alterações morfológicas em diferentes graus histopatológicos. Embora muitas das alterações morfológicas causadas pelo inseticida sejam reversíveis (grau de lesão: 1), também ocorrem lesões graves e irreversíveis ao epitélio do intestino médio (grau de lesão: 3), como a perda do contato celular, danos e esgotamento dos ninhos de células regenerativas, indicando que embora o teflubenzurom seja classificado como não tóxico para organismos não-alvos, o teflubenzuron causa danos ao intestino médio de *A. mellifera* com potencial para comprometer os processos de digestão e absorção. Alguma toxicidade para abelhas (Ferrazzi, 2003), incluindo *A. mellifera* (Gromisz, 1996, Ahn et al., 2013; Piechowicz et al., 2013) tem sido reportado para esse inseticida.

## 6. Conclusão

A exposição crônica de operárias de *A. mellifera* ao teflubenzurom em concentração campo-realista indica sua potencialidade como agente contribuinte para o CCD e para o declínio

global das abelhas. A letalidade aqui observada pode estar associada à sobrecarga dos sistemas de detoxificação das células do intestino médio, resultando em danos reversíveis e irreversíveis nas células digestivas, regenerativas e na matriz peritrófica comprometendo a digestibilidade. No geral, este estudo fornece uma base teórica e prática sobre o conhecimento dos efeitos do inseticida inibidor da síntese de quitina em insetos adultos não-alvo, como a abelha *Apis mellifera*.

### Referências Bibliográficas

- Aguiar, A., Deans, A. & Engel, M. (2013). Order Hymenoptera. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). Zootaxa, 3703, 1–82.
- Ahn, K., Yoon, C., Kim, K., Nam, S., Oh, M. & Kim, G. (2013). Evaluation of Acute and Residual Toxicity of Insecticides Registered on Strawberry against Honeybee (*Apis mellifera*). The Korean Journal of Pesticide Science, 17(3), 185-192.
- Amaral, E. (1972). Polinização entomófila de *Coffea arabica* L., raio de ação e coleta de pólen pela *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), em cafezal florido. [Tese Livre Docência, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz] Repositório USP.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. & Schenck, F. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid- 86 phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 83.
- Ballan-Dufranc, Christiane. (2002). Localization of Metals in Cells of Pterygote Insects. Microscopy Research and Technique, 56, 403-420.
- Ballantyne, G., Baldock, K., Rendell, L. & Wilmer, P. (2017). Pollinator importance networks illustrate the crucial value of bees in a highly speciose plant community. Scientific Reports 7(8389), 1-13.
- Bancroft, J. & Gamble, M. (2008). Theory and practice of histological techniques. London, Churchill Livingstone.
- Barbosa, M., Zuffi, F., Maruxo H. & Jorge, L. (2009). Therapeutic properties of propolis for treatment of skin lesions. Acta Paul Enferm, 22(3), 318-22.
- Batista, A., Domingues, C., Costa, M. & Silva-zacarin, E. (2020). Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? Journal of Apicultural Research, 59(5), 1-10.
- Bawa, K. S. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. Annual Review of Ecology and Systematics 21, 399-422.

- Beekman, M. & Ratnieks, F. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.*, 14(4), 490-496.
- Bernardo, C., Souza, I., Colavitti, C. & Garcia, C. (1990). Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. *Rev. Bras. Enferm.*, 43(1/4), 101-6.
- Bernet, D., Schmidt, H., Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22, 25-34.
- Beutel, R., Friedrich, F., Ge, S. & Yang, X. (2013). *Insect Morphology and Phylogeny: A Textbook for Students of Entomology*. de Gruyter.
- Blacquiére, T., Smagghe, G., Van Geste, C. & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973-992.
- Bolognesi, R. (2005). Síntese, degradação e função da membrana peritrófica dos insetos. [Tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo].
- Bolognesi, R., Terra, W. & Ferreira, C. (2008) Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *J. Ins. Physiol* 54, 1413-1422.
- Bolones, I; Renata, T., Walter, R. & Ferreira, C. (2008). Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency Theoretical and experimental models Renata Bolognesi, *Journal of Insect Physiology* 54, 1413-1422.
- Bortolli, L., Montanari, R., Marcelino, J., Mendrzycki, P., Maini, S. & Porrini, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology, Bologna*, 56(1), 63-67.
- Brodtschneider, R. & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278-294.
- Caccia, S., Casartelli, M. & Tettamanti, G. (2019) The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Research* 377, 505-525.
- Carneiro, L, Martinez, L., Oliveira, A, Cossolin, J., Resende, M., Gonçalves, W., Medeiros-Santana, L. & Serrão, J. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment*, 815(152847), 1-9.
- Carneiro, F. (2015). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. *Expressão Popula*.
- Carvalho, S., Carvalho, G., Carvalho, C., Bueno F. & Baptista, A. (2009). Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 76(4), 597-606.

- Castilhos, D., Bergamo, G., Gramacho, K. & Gonçalves, L. (2019). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50, 263-272.
- Castro, M., Martinez, L., Cossolin, J., Serra, R. & Serrão, J. (2020). Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248, 1-11.
- Catae, A., Roat, T., Oliveira, R., Nocelli, R. & Malaspina, O. (2014). Cytotoxic Effects of Thiamethoxam in the Midgut and Malpighian Tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy Research and technique* 77, 274-281.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R., Biswas S., Schuler M., Berenbaum M., Feyereisen R., Oakeshott J. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol.*, 15(5).
- Couto, L. & Mendes, J. (1996). Influência da polinização entomófila na cultura do feijão guandu (*Cajanus cajan* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Teresina, Brasil.. Anais. Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996, p. 329.
- Cruz, A., Silva-Zacarin, E., Bueno, O. & Malaspina, O. (2009). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee. *Cell Biology and Toxicology*, 26(2), 165-176.
- Cruz-Landim, C. (1999). Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology*. Chico: Calif State Univ., 34(3), 597-603.
- Cruz-Landim, C. (2009). *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP.
- Cruz- Landim, C. & Serrão, J. (1997) Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretrions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology*. 47, 21-29.
- Cruz-Landim, C., & Costa-Leonardo, A. (1996). Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1), 129-130.
- Cruz-Landim, C., Silva de Moraes, R. & Serrão, J. (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal Comparative Biology* 1, 29-40.
- D´avila, M. & Marchini, L. (2005). Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. *Indústr.anim.*, N. Odessa, 62(1), 79-90.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluseau, S. & Pham-delegue, M. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybees *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, 48, 242-250.

- DeGrandI-Hoffman, G. & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176.
- Denecke, S., Swers, L., Douris, V. & Vontas, J. (2018). How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 22-35.
- Dhadialla, T., Retnakaran A. & Smagghe G. (2005). Insect growth- and developmental-disturbing insecticides. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6, 55-115.
- Doonan, F. & Cotter, T. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 44(3), 200-204.
- Erlandson, M., Toprak, U. & Hegedus, D. (2019). Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *J. Insect Physiol.*, 117, 103894, 1-11. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.103894
- Farder-Gomes, C.F., Santos, A.A., Fernandes, K.M., Bernardes, R.C., Martins, G.F. and Serrao, J.E. (2022) Fipronil exposure compromises respiration and damages the Malpighian tubules of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Science and Pollution Research* 29, 88101-88108.
- Farder-Gomes, C, Fernandes, K., Bernardes, R., Bastos, D., Oliveira, L., Martins, G. & Serrão, J. (2021a). Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). *Science of the Total Environment*, 794, 148678, 1-10.
- Farder-Gomes, C., Fernandes, K., Bernardes, R., Bastos, D., Martins, G. & Serrão, J. (2021b). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, 774, 145679, 1-8.
- Fávero, A., Moraes, J. & Perdigão, J. (2000). Polinização entomófila em duas variedades de café (*Coffea arabica* var. Mundo Novo e var. Catuaí Vermelho). In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto, Brasil.
- Fávero, A. & Nogueira-Couto, R. (2000). Polinização entomófila em soja (*Glycine max* L. var. FT2000). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Florianópolis, Brasil.
- Ferrazzi, P. & Elia, E. (2003). Teflubenzuron effects on the red mason bee: a preliminary test set up in microcosm. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 165-168.
- França, A., Neves, C., Cruz, L., Vianna, P. & Serrão, J. (2006). Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A comparative study of workers and queens. *Brazilian Journal Morphological Science* 23(3/4), 129-136.
- Frankie, G., Vinson, S., Newstrom, L., Barthell, J., Haber, W. & Frankie, J. (1990). Plant phenology, pollination ecology, pollinator behavior and conservation of pollinators in

neotropical dry forest. pp. 37-47 in K. S. Bawa and M. Hadley, eds., *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants, Man in the Biosphere Series, 7*. Paris: UNESCO. 1990.

- Friedle, C., Wallner, K., Rosenkranz, P., Martens, D. & Vetter, W. (2021). Pesticide residues in daily bee pollen samples (April–July) from an intensive agricultural region in Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 22789–22803.
- Ballan-Dufranc, C. (2002). Localization of Metals in Cells of Pterygote Insects. *Microscopy Research and Technique*, 56, 403-420.
- Grella, T., Soares-Lime, H., Malaspina, O. & Nocelli, R. (2019). Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere*, 236, 1-5.
- Gromiz, Z. & Gromiz, M. (1996). Harmful effects of the Nomolt formulation on honey bees, *Pszcz. Zesz. Nauk*, 40, 175-183.
- Guo, W., Kain, W. & Wang, P. (2019). Effects of disruption of the peritrophic membrane on larval susceptibility to Bt toxin Cry1Ac in cabbage loopers. *J. Insect Physiol.*, 117(203897), 1-6.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 54, 285-302.
- Hung, K., Kingston, J., Albrecht, M., Holway, D. & Kohn, J. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of Royal Society London*, 285(20172140), 1-8.
- Jesus, D., Silva-Zacarin, E., Cruz, A., Bueno, O. & Malaspina, O. (2017). Epithelial renewal in the midgut of *Apis mellifera* after treatment with boric acid. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE, Búzios, Brasil.
- Júnior, A., Lopes, M., Colombari, V., Monteiro, A. & Vieira, E. (2006). Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36(1), 294-297.
- Kakamand, F., Talal T. & Mahmoud, A. (2008). The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. *J. Dohuk Univ.*, 11(1), 154-151.
- Kelkenberg, M., Odman-Naresha, J., Muthukrishnanb, S. & Kitajima, H. M. (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.
- Kotaka, C., Mitsui, M. & Vieira, R. (2004). Polinização por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em cultura de canola (*Brassica napus* e *B. campestris*, Cruciferae) na região de Maringá, PR. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG, Brasil.

- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N. & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 15966-15971.
- Lahane, M. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525-550.
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S. & Gauthier, M. (2001). Imidacloprid Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. New York, 48, 129-134.
- Lipovsek, S., Letofsky-Pabst, I., Hofer, F. & Pabst, M.A. (2002). Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulus* (Opiliones). *Micron*, 33, 647-654.
- Lipovsek, S., Letofsky-Papst, I., Hofer, F., Pabst, M.A. & Devetak, D. (2012). Application of analytical electron microscopic methods to investigate the function of spherites in the midgut of the larval antlion *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeolontidae). *Microscopy Research and Technique*, 75, 397-407.
- Liu, X., Cooper, A., Zhang, J. & Zhu, K. (2019). Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *J. Insect Physiol.* 114, 109-115. 2019.
- Lorenzon, M., Martinho, M., Freire, J., & Reis, F., (1993). Efeito da polinização por abelhas na produção de sementes híbridas da cebola. *Pesq. agropec. bras.*, 28(2), 229-235.
- Malaspina, O. & Zacarin, E. (2006). Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Braz. j. morphol. sci.*, 23(3/4), 303-309.
- Marques-Silva, S., Serrão, J. & Mezêncio, J. (2005). Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. *Acta histochemica*, 107, 23-30.
- Martin, G.G., Simcox, R., Nguyen, A. & Chilingaryan, A. (2006). Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability. *Biol. Bull.* 211, 275-285.
- Matsumura, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 133–139.
- Merzendorfer, H., Kim, H.S., Chaudhari, S.S., Kumari, M., Specht, C.A., Butcher, S., Brown, S.J., Robert Manak, J., Beeman, R.W., Kramer, K.J. & Muthukrishnan, S. (2012). Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem.. Mol. Biol.* 42, 264-276.
- Message, D., Teixeira, E. & De Jong, D. (2012). Situação da sanidade das abelhas no Brasil. In: Fonseca, V. L. I.; Canhos, D., Alves, D., Saraiva, A. (Org.). *Polinizadores no*

Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: Edusp, 237-256.

- Michener, Charles D. (2007). The bees of the world. 2 edition. The Johns Hopkins University press.
- Mommaerts, V., Sterk, G. & Smagghe, G. (2006). Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in bumblebees *Bombus terrestris* Pest Manag, Sci 62, 752-758.
- Moreno-González, D., Cutillas, V.; Hernando, M., Alcántara-Durán, J., García-Reyes, J. & Molina-Día, A. (2020). Quantitative determination of pesticide residues in specific parts of bee specimens by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. Science of the Total Environment, 715., 1-9.
- Moreti, A. (1989). Estudo sobre a polinização entomófila do girassol (*Helianthus annuus* L.) utilizando diferentes métodos de isolamento da flora. [Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz]. Biblioteca digital USP.
- Morgado, L. & Carvalho, C. (2000). Estudo da fauna de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em um agroecossistema de girassol (*Helianthus annuus*) na região de Lavras, Minas Gerais. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto, Brasil.
- Nasonkin, I., Alikasifoglu, A., Ambrose, C., Cahill, P., Cheng, M., Sarnaik, A., Egan, M. & Thomas, P. (1999). A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system, J. Biol. Chem., 274(41), 29420-29425.
- Nicodemo, D. & Nogueira-Couto, R.H. (2002). Biologia floral, insetos visitantes e o efeito das visitas das abelhas *Apis mellifera* nas flores de moranga (*Cucurbita maxima* Duch.) quanto a produção de frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Campo Grande, Brasil.
- Nocelli, R., Roat, T., Zacarin, E. & Malaspina, O. (2012). Riscos de pesticidas sobre as abelhas. Semana dos Polinizadores, 3, 196-212.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. Test No. 213 Section 2.
- Oliveira, A., Souza, A., Resende, M., Carneiro, L., Oliveira, J., Serra, R. & Serrão, J. (2022). The peritrophic matrix delays *Nosema ceranae* infection in the honey bee *Apis mellifera* midgut. Physiological Entomology, 1-7,
- Oliveira, A.H., Fernandes, K.M., Gonçalves, W.G., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. Arthropod Structure & Development 53(100885), 1-9.
- Paulino, F. & Marchini, L. (2000). Polinização biológica da macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) e sua influência na fixação e qualidade dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Florianópolis, Brasil.

- Piechowicz, B., Grodzicki, G., Stawarczyk, M. & Stawarczyk, K. (2013). Circadian and Seasonal Changes in Honeybee (*Apis mellifera*) Worker Susceptibility to Diazinon, Teflubenzuron, Pirimicarb, and Indoxacarb. *Pol. J. Environ. Stud.*, 22(5), 1457-1463.
- Pinheiro, A. & Cândido, J. (2009). *As árvores e a apicultura*. Arca editora LTDA.
- Pinheiro, D., Conte, H. & Gregório, E. (2008) Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *Biocell*, 32, 61-67.
- Pires, C., Pereira, F., Lopes, Maria T., Nocelli, R., Malaspina, O., Pettis, Jeffrey S. & Teixeira, É. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? *Pesq. agropec. bras.*, 51(5), 422-442.
- Richards, O. & Davies, R. (1977). *Imms' General Textbook of Entomology. Volume 2: Classification and Biology*. Springer, Dordrecht.
- Sadlova, J., Homola, M., Myskova, J., Jancarova, M. & Volf, P. (2018). Refractoriness of *Sergentomyia schwetzi* to *Leishmania* spp. is mediated by the peritrophic matrix. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12(4), 1-19.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees - a risk assessment. *PLoS One*, 9(4), 1-16.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment international*, 89, 7-11.
- Serra, R., Cossolin, J., Resende, Matheus T., Castro, M., Oliveira, A., Martínez, L. & Serrão, J. (2021). Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 270, 1-8.
- Silva, R., Maia, G., Sousa, P. & Costa, J. (2006). Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. *Alim. Nutr.*, 17(1), 113-120.
- Silvano, A., Silva, K., Frade, R. & Ribeiro, M. (2020). Uso da apitoxina como recurso terapêutico para a artrite reumatoide: uma revisão integrativa. *Revista NBC - Belo Horizonte*, 10(19), 108-1250.
- Simon-Delso, N., Martin, G. Bruneau, E., Minsart, L., Mouret, C. & Hautier, L. (2014). Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *Plos One*, 9(7), 1-16.
- Snodgrass, R. E. (1993). *Principles of insect morphology*. Cornell University Press.
- Souza, T. F. (2009). Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais. [Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Rio Claro.

- Stoner, K. & Eitzer, B. (2012). Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS One*, 7(6) 1-5.
- Teixeira, A., Marques-Araujo, S., Zancunio, J. & Serrão, J.E. (2015). Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron*, 68, 91-97.
- Teixeira, A., Marques-Araujo, S., Zancunio, J.C. & Serrão, J.E. (2019). Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, 58, 463-468.
- Tunaz, H. & Uygun, N. (2004). Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 337-387.
- Tong, Z., Duan, J., Wu, Y.,; Liu, Q., He, Q., Shi, Y., Yu, L. & Cao, H. (2018). A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. *Science of the Total Environment*, 640(641), 1578-1586.
- Urstadt, K. R. (2022). Staining intensity quantification protocol. [https://docs.google.com/document/d/1BagSem-WTosS1PKZo17T40u7fZFIPdIIr1Yuwg4EF\\_A/edit#heading=h.bxx1hlqvtvka](https://docs.google.com/document/d/1BagSem-WTosS1PKZo17T40u7fZFIPdIIr1Yuwg4EF_A/edit#heading=h.bxx1hlqvtvka).
- Pires, C., Pereira, F., Lopes, M., Noceli, R., Malaspina, O., Petis, J. & Teixeira, E. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51, 422-442.
- Van Engeldorp, D., Evans, J., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Coxfooster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarp, D. & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, 4(8), 1-17.
- Vázquez, P., Lozano, A., Uclés, S., Gómez Ramos, M. & Fernández-Alba, A. (2015). A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1426, 161-173.
- Williams, G., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D., Medrzycki, P., Murray, T., Natsopoulou, M., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R., Pernal, S., Shutler, D., Tanner, G., Van Der Steen, J. & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J. Apic. Res.*, 52, 1-36.
- Whitehorn, P., O'Connor, S., Wackers, F. & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336, 351-352.
- Witter, S. & Blochtein, B. (2003). Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 38(12),1399-1407.
- Xu, J., Strange, J. P., Welker, D. L., & James, R. R. (2013). Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii*(Hymenoptera: Apidae). *BMC genomics*, 14(1), 1-13.

- Wu, K. & Hoy, M. (2016). The Glutathione-S-Transferase, Cytochrome P450 and Carboxyl/Cholinesterase Gene Superfamilies in Predatory Mite *Metaseiulus occidentalis*. *PLoS One*, 11(7), 1-20.
- Zaluski, R. (2017). Efeito de dose subletal de fipronil e piraclostrobina, isoladas ou associação, na morfologia de glândulas e proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* L. [Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia].
- Zattara, E., Aizen, M. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114–123.