

EFEITOS DE INSETICIDAS, HERBICIDA E DO COMPOSTO LIMONENO SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA EM ABELHAS *Apis mellifera*

por

CATIANE OLIVEIRA SOUZA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* possuem importância ecológica, econômica e social, pois são essenciais para manutenção da biodiversidade de plantas silvestres e agrícolas, e para a produção de mel e outros produtos apícolas bastante requisitados pela indústria de alimento, farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, tem se observado nos últimos anos um declínio de populações de abelhas, muitas vezes atribuído ao distúrbio do colapso das colônias (CCD), que é associado, entre outros fatores, ao uso excessivo de agrotóxicos. Assim, este estudo objetivou avaliar se produtos sintéticos e naturais possuem influência sobre o declínio de abelhas, analisando possíveis alterações histofisiológicas no intestino médio de *A. mellifera*, e consequentemente as modificações nutricionais das abelhas tratadas com um inseticida botânico Azamax® e o composto Limoneno em comparação ao inseticida sintético Karate e o herbicida Glifosato. A contaminação dos produtos e composto se deu por ingestão pelo período de 24h. O inseticida Karate e o composto Limoneno foram altamente tóxicos as *A. mellifera*, e o Glifosato apresentou baixa toxicidade, já o Azamax® foi repelente as abelhas na dose recomendada de campo. Todas as substâncias avaliadas causaram danos nas células digestivas sendo possível observar o comprometimento da matriz peritrófica. Consequentemente, todos os tratamentos acarretaram em uma redução na absorção de nutrientes (proteína, lipídio, açúcar total e glicogênio) pelas abelhas, onde o Limoneno e o herbicida Glifosato

acarretaram em uma diminuição mais acentuada das proteínas totais. Esses resultados, além de reforçar o impacto de defensivos agrícolas sobre os polinizadores, neste caso sobre as abelhas *A. mellifera*, indicam que os produtos naturais podem ser igualmente ou mais prejudiciais aos insetos benéficos quando comparados aos produtos sintéticos. Vale ressaltar, que a repelência causada pelo inseticida botânico Azamax[®] em altas dosagens, é uma vantagem por ser mais difícil o contato das abelhas com este defensivo, em campos agrícolas.

PALAVRAS-CHAVE: Polinizadores, CCD, agrotóxicos, intestino médio, histologia, histoquímica, nutrição.

EFFECTS OF INSECTICIDES, HERBICIDE AND LIMONENE COMPOUND ON
DIGESTIVE HISTOPHYSIOLOGY IN HONEY BEES *Apis mellifera*

por

CATIANE OLIVEIRA SOUZA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

ABSTRACT

Apis mellifera bees have ecological, economic and social importance, as they are essential for maintaining the biodiversity of wild and agricultural plants, and for the production of honey and other bee products that are highly requested by the food, pharmaceutical and cosmetics industry. However, a decline in bee populations has been observed in recent years, often attributed to colony collapse disorder (CCD), which is associated, among other factors, with the excessive use of pesticides. Thus, this study aimed to evaluate whether synthetic and natural products have an influence on the decline of bees, analyzing possible histophysiological changes in the midgut of *A. mellifera*, and consequently the nutritional changes of bees treated with a botanical insecticide (Azamax®) and the compound limonene compared to the synthetic insecticide lambda-cyhalothrin and the herbicide glyphosate. Contamination of the products and compost occurred by ingestion for a period of 24 hours. The lambda-cyhalothrin insecticide and the limonene compound were highly toxic to *A. mellifera*, and glyphosate showed low toxicity, while Azamax® was repellent to bees at the recommended field dose. All substances evaluated caused damage to digestive cells and it was possible to observe the impairment of the peritrophic matrix. Consequently, all treatments resulted in a reduction in the absorption of nutrients (protein, lipid, total sugar and glycogen) by bees, where the compound limonene and the herbicide glyphosate resulted in an accentuated decrease in total

proteins. These results, in addition to reinforcing the impact of pesticides on pollinators, in this case on *A. mellifera* bees, indicate that natural products may be equally or more harmful to beneficial insects when compared to synthetic products. It is worth mentioning that the repellency caused by the botanical insecticide Azamax® at high dosages is an advantage because it is more difficult for bees to contact this pesticide in agricultural fields.

KEY WORDS: Pollinators, CCD, pesticides, midgut, histology, histochemistry, nutrition.

EFEITOS DE INSETICIDAS, HERBICIDA E DO COMPOSTO LIMONENO SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA EM ABELHAS *Apis mellifera*

por

CATIANE OLIVEIRA SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2022

EFEITOS DE INSETICIDAS, HERBICIDA E DO COMPOSTO LIMONENO SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA EM ABELHAS *Apis mellifera*

por

CATIANE OLIVEIRA SOUZA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz – UFRPE

Carolina Arruda Guedes – PNPd/UFRPE

EFEITOS DE INSETICIDAS, HERBICIDA E DO COMPOSTO LIMONENO SOBRE A
HISTOFISIOLOGIA DIGESTIVA EM ABELHAS *Apis mellifera*

por

CATIANE OLIVEIRA SOUZA

Banca Examinadora:

Valéria Wanderley Teixeira– UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira– UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz– UFRPE

Catiane Oliveira Souza
Mestre em Entomologia

Prof. Valéria W. Teixeira – UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S729e Souza, Catiane Oliveira
 Efeitos de inseticidas, herbicida e do composto limoneno sobre a histofisiologia digestiva em abelhas *Apis mellifera*
 / Catiane Oliveira Souza. - 2022.
 61 f. : il.
- Orientadora: Valeria Wanderley .
 Coorientadora: Glaucilane dos Santos .
 Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
 Agrícola, Recife, 2022.
1. Polinizadores. 2. CCD. 3. Agrotóxicos. 4. Intestino médio. 5. Histologia. I. , Valeria Wanderley, orient. II. ,
 Glaucilane dos Santos, coorient. III. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria Valdecí de Oliveira e a minha avó Cordolina Rosa de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me possibilitado a conclusão de mais uma etapa na minha formação, e por toda proteção ao longo da minha caminhada.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À minha mãe Maria Valdeci pelo exemplo de mulher forte e mãe solo, e pelo amor, orações, auxílio, ensinamentos e conselhos. A minha avó Cordolina pelo amor e cuidado de sempre. A todos os meus familiares, em especial ao meu pai Edmilson e a minha irmã Bruna, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim. E ao meu companheiro, Fernando Henrique, por todo carinho e suporte ao longo desses dois anos de curso.

À minha orientadora Valéria Wanderley Teixeira pela orientação e pela dedicação em fazer eu me tornar uma profissional melhor, e por me acolher no Laboratório de Fisiologia de Insetos.

As minhas coorientadoras Glaucilane Cruz e Carolina Guedes pelo apoio, paciência e ensinamentos. Principalmente à Glaucilane pela amizade e pelo amparo na minha chegada a Recife.

Ao prof. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela disponibilidade.

Ao prof. Júlio César dos Santos Nascimento por conceder as abelhas utilizadas nesta pesquisa.

Por fim, aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia de Insetos e do Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados e a todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	x
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	8
2 CONSEQUÊNCIAS DO USO EXCESSIVO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS EM ABELHAS: UMA DAS PROVÁVEIS CAUSAS DO CCD.....	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
BIOLOGIA DA ABELHA <i>Apis mellifera</i>	20
IMPACTO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i>	23
AGRADECIMENTOS.....	25
LITERATURA CITADA.....	25
3 TOXICOLOGIA, ALTERAÇÕES HISTOFISIOLÓGICAS E NUTRICIONAIS EM <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) SUBMETIDAS AO COMPOSTO LIMONENO E A INSETICIDA BOTÂNICO EM COMPARAÇÃO A INSETICIDA SINTÉTICO E HERBICIDA.....	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30

INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO.....	41
AGRADECIMENTOS.....	44
LITERATURA CITADA.....	45
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A polinização é o processo em que ocorre a movimentação do pólen dentro ou entre flores, no qual ele é transferido de uma antera para um estigma e resulta na produção de sementes e frutos através da fertilização sexual, exercendo, desta forma, uma função ecossistêmica importante para reprodução de plantas e conservação de sua biodiversidade, além de impactar na produção de cultivos agrícolas (Buchmann & Nabhan 1996, Kevan & Imperatriz-Fonseca 2002, Klein et al. 2007, Ricketts et al. 2008, Eardley et al. 2016).

A maioria das plantas são polinizadas por insetos e outros animais e a ausência deste fenômeno acarretaria em uma redução da produção agrícola de 90%, em 12% das principais culturas mundiais, e 28 % das culturas teriam uma perda na produção entre 40 e 90% (Eardley et al. 2016). Além disso, vários cultivos, que são auxiliados por esses organismos durante o processo de fecundação, são fontes de vitaminas e minerais fundamentais para saúde humana. Logo, a conservação desses animais é essencial para segurança alimentar da humanidade, porém a polinização está entre os 15 serviços ecossistêmicos apontados com o estado em declínio pela Avaliação Ecossistêmica do Milênio (Chopra et al. 2005, Eilers et al. 2011, Chaplin-Kramer et al. 2014, Smith et al. 2015).

Dentre os animais que cumprem esse papel temos as abelhas, moscas, borboletas, mariposas, besouros, tripes, vespas e vertebrados (Kevan & Baker 1983, Scoble 1995, Proctor et al. 1996, Elberling & Olesen 1999, Larson et al. 2001, Willmer 2011). Dentro desta variedade, os insetos são os principais polinizadores de culturas agrícolas, sendo as abelhas as mais conhecidas. Elas surgiram em decorrência de um processo evolutivo que coincide com a chegada das flores a cerca de 135 milhões de anos atrás. São descendentes das vespas, que pararam os seus hábitos predatórios e

começaram a se alimentar do pólen. Atualmente mais de 20 mil espécies de abelhas são conhecidas, e apenas 2% são sociais e produzem mel (Camargo et al. 2002, Hu et al. 2008).

Desde os tempos pré-históricos que o mel é requisitado como mercadoria. É o adoçante mais antigo conhecido e se trata de um líquido doce de cor dourada e viscoso (Thomas & Schumann 1992, NHB 1998, FAO 2002), é produzido a partir do néctar das flores e composto por açúcares, água, minerais, uma pequena quantidade de vitaminas e outros nutrientes. Além do mel, diferentes produtos são derivados da apicultura, tais como cera, própolis, geleia real, pólen apícola e a apitoxina (Krell 1996, Barbosa et al. 2007, Jull et al. 2015).

Dentre as produtoras de mel, a abelha europeia *Apis mellifera* (Linnaeus) foi introduzida pelos europeus nas Américas durante o período de colonização, e então foi levada para Ásia, logo, é comum, a prática da apicultura com esta espécie. Além disso, a *A. mellifera* passou a ser muito utilizada para polinização de culturas em sistemas de agricultura intensiva, permanecendo em abundância em todos os continentes (Southwick & Southwick 1992, Morse & Calderone 2000, Kevan 2007).

A produção do Brasil no ano de 2020 foi de 51.508 ton de mel, o país se encontra em 10^a posição na escala mundial, em primeiro lugar está a China com 466.487 ton, seguida da Turquia e Irã, com 104.077 ton e 79.955 ton, respectivamente (FAO 2022). O mel produzido na região nordeste do Brasil se destaca no mercado mundial, por ser considerado um produto orgânico caracterizado pela utilização de vegetação nativa pelas abelhas (Vidal 2019).

Mesmo com o potencial nordestino para apicultura, atribuído às condições ambientes e adaptabilidades da espécie *A. mellifera* (Garcia & Couto 2005), os períodos de secas característico da região resultam na redução de produção de mel (Vidal 2019), além do mais, há relatos da perca generalizada de abelhas em todo o mundo (Aizen et al. 2016).

O Distúrbio do Colapso das Colônias, também chamado de CCD (Colony Collapse Disorder), foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos para se referir ao declínio, a princípio, de abelhas *A. mellifera* no país, sendo caracterizado por um conjunto de sintomas desencadeados devido ao efeito de uma série de fatores estressantes que agem de forma conjunta. Atualmente, o CCD também é relacionado com o declínio de espécies de abelhas nativas (VanEngelsdorp et al. 2007, VanEngelsdorp et al. 2008, Graystock et al. 2013)

Estudos indicam que o uso de defensivos agrícolas são um dos fatores que influenciam no declínio das colônias. Grande parte dos trabalhos são voltados a pesquisas com inseticidas do grupo químico neonicotinóide, logo, pouco se sabe sobre os outros inseticidas e herbicidas (Bryden et al. 2013, Godfray et al. 2014, Kovács-Hostyánszki et al. 2016).

Porém, os pesticidas do grupo químico piretróide é um exemplo de agroquímico que deve ser melhor avaliado quanto a seus efeitos sobre o declínio das abelhas, ao considerar que também são neurotóxicos com ampla utilização na agricultura, eles atuam nos canais de sódio dos axônios ao permitir a entrada contínua dos íons de sódio, fazendo com que o inseto tenha o sintoma de paralisia seguido de morte (Wang & Wang 2003, AGROFIT 2022).

Além disso, foi identificado na Europa casos de mortalidade de *A. mellifera* em que 27% estavam correlacionados a presença de inseticidas organofosforados ou compostos carbamatos, 14% tinham inseticida organoclorado e em 7,8% continham piretróides, e nenhum caso foi correlacionado com neonicotinóides (Thompson & Thorbahn, 2009).

De acordo com dados da FAO (2022), o uso de defensivos químicos no Brasil em 2019 permaneceu estável, com a mesma marca de 377.176 ton quando comparado aos anos anteriores. Porém quando se compara a proporção de inseticidas e herbicidas separadamente, é perceptível a maior demanda pelo segundo, onde o seu consumo chegou a 234.384 ton, muito superior a 60.607 ton de inseticidas consumidos pelo país.

O glifosato [N- (fosfonometil) -glicina] é um herbicida não seletivo e sistêmico, ele interrompe a via metabólica do ácido chiquímico o que impede a síntese de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento da planta (Battaglin et al. 2005; Evans et al. 2010) e por isso obtém baixa toxicidade aos demais organismos, ou seja, é recorrido por todo o mundo devido a sua eficiência de controle, poucos danos ao meio ambiente e aos animais (Schuette 1998, Dill et al. 2010).

Além do mais, o glifosato foi favorecido pela introdução de plantas transgênicas resistentes a este herbicida (Ruiz-Toledo & Sánchez-Guillén 2014), porém essas circunstâncias podem ser a causa dos efeitos negativos a indivíduos aquáticos, anfíbios e aves, sobretudo na reprodução, e ainda a perda da diversidade de insetos (Relyea 2005, Evans et al. 2010, Jones et al. 2011), em especial, as espécies de abelhas ao diminuir sua fonte de alimento, afetando, de forma indireta, no declínio das colônias (Kovács-Hostyánszki et al. 2016).

Por outro lado, atualmente se tem muita procura por produtos que não agredam o meio ambiente, entre eles os óleos essenciais extraídos de plantas de várias espécies e que são bastante estudados quanto aos seus efeitos inseticida ou repelente (Ibrahim et al. 2001, Nerio et al. 2010). Eles possuem baixa persistência no meio ambiente e baixa toxicidade a mamíferos, com atuação bem diversificada, pode agir por deterrência, repelência, mortalidade, inibição do crescimento, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos, entre outros (Isman 2006).

O uso dessas substâncias, como também de alguns de seus compostos isolados, são alternativas de controle quanto ao uso de pesticidas sintéticos contra artrópodes pragas (Araújo et al. 2012, Born et al. 2012, Nascimento et al. 2012, Alves et al. 2013, Oliveira et al. 2015, Camara et al. 2015). Embora os óleos essenciais exibam boas características do ponto de vista sustentável, não se tem evidências suficientes para garantir que esses produtos não atingem os insetos benéficos.

Umpiérrez et al. (2017), por exemplo, encontraram toxicidade diferente em abelhas (*Apis mellifera*) ao testar os efeitos inseticidas do óleo essencial de duas espécies de Asteraceae

(*Eupatorium buniifolium* e *Artemisia absinthium*) sobre as pragas de tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), no qual a dosagem necessária para o controle de *T. vaporariorum* não foi tóxica para *A. mellifera*, porém o mesmo não ocorreu com a dosagem para o controle efetivo de *T. absoluta*, sendo esta tóxica para as abelhas. Isso mostra a complexidade de interações que podem existir para o desenvolvimento de inseticidas botânicos que realmente não venham afetar o ecossistema natural do ambiente.

Dentre os compostos, oriundos dos óleos comumente utilizados no controle de pragas, temos o limoneno, um hidrocarboneto já bastante difundido na agricultura. Classificado como terpeno monocíclico, está presente na maior parte da composição dos óleos essenciais de plantas de citrus, mas também é abundante em óleos de outras plantas. Podendo ser encontrado na natureza em duas formas isômeras, d-limoneno e r-limoneno (Ferrarini et al. 2008, Cruz et al. 2016).

O isômero r-limoneno é um composto aromático que caracteriza o odor de laranja e limão. Ele é o principal componente do óleo de laranja que é fabricado pela indústria brasileira como subproduto da produção de suco laranja (Pires 2018). Além do limoneno ser considerado seguro como aditivo em fragrâncias e alimentos ou aromatizante, pela FDA (Food and Drug Administration/EUA), estudos revelam que o r-limoneno possui qualidades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianase, nematicida e inseticida (Aggarwal et al. 2002, Hirota et al. 2010, Giarratana et al. 2015, Giarratana et al. 2016, Oliveira et al. 2021).

O isômero d-limoneno teve o primeiro registro como inseticida nos Estados Unidos em 1958, e como antibactericida em 1971, sendo um composto considerado de baixa toxicidade a mamíferos, aves e peixes, além de não prejudicar e nem repelir as abelhas (Hollingsworth 2005, Ciriminna et al. 2014). O uso do limoneno pode ser muito versátil, além de inseticida, pode ser utilizado como bio-solvente alternativo, na produção de polímeros avançados e para tecnologia de microencapsulação (Ciriminna et al. 2014).

Estudos que demonstram os efeitos de óleos essenciais ou compostos derivados na fisiologia de insetos são promissores, porém, a grande maioria foca nos aspectos tóxicos em indivíduos considerados pragas (Olivo et al. 2008, Senra 2013, Tak et al. 2015). Cruz et al. (2017), por exemplo, constataram em estudos com a praga do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), quanto a aplicação tópica dos compostos limoneno e trans-anethole, mudanças adversas em aspectos fisiológicos reprodutivos bem como a diminuição de nutrientes: proteínas, lipídios e açúcares. Deste modo, mesmo que o limoneno seja considerado seletivo a abelhas *A. mellifera*, é preciso um maior interesse por pesquisas que aferem os efeitos deste terpeno sobre aspectos fisiológicos desses insetos polinizadores.

A azadiractina é outro composto natural isolado de sementes da árvore de nim, *Azadirachta indica* (A. Juss) pertencente à família Meliaceae. São limonoides (tetranortriterpenóide) criados a partir dos metabólitos secundários produzidos pelas *A. indica* (Mordue (Luntz) & Nisbet. 2000). O modo de ação do nim se dá pela ingestão e não através do contato com o produto em si (Martinez & Van Emden 2001), desta forma se torna uma boa opção para manejar a população de insetos benéficos. As pragas são atingidas pela exposição à toxina ou pela diminuição da reprodução (esterilizante) e crescimento, e não necessariamente pela morte imediata dos indivíduos como é comum na maioria dos inseticidas (Roy & Saraf 2006), seu modo de ação ainda está relacionado à supressão de apetite e inibição da síntese de quitina dos insetos (Cassier & Papillon. 1991, Viegas Jr. 2003).

Os vários modos de ação da azadiractina aliado à suposta segurança na utilização conjunta com inimigos naturais contribuem para o uso generalizado dos compostos derivados de nim ao redor do mundo, incrementado pela possibilidade de aplicação na agricultura orgânica (Martinez & Van Emden 2001, Silva & Martinez 2004, Isman 2006; Mordue et al. 2010). Apesar do emprego desta substância como uma solução no Manejo Integrado de Pragas, a mesma foi demonstrada por Silva

et al. (2020), capaz de alterar o sistema imunológico do predador generalista *Podisus nigrispinus* (Dallas) ao modificar a sua dinâmica hemocitária, e reduzir os níveis de fenoloxidase e óxido nítrico afetando, portanto, o estado imunitário de *P. nigrispinus*. Isso deixa claro a necessidade de se realizar novos estudos que mostrem como esses compostos naturais podem interferir na fisiologia de diferentes insetos benéficos mesmo ditos seguros para polinizadores e inimigos naturais.

As pesquisas que abrangem os impactos do uso elevado de defensivos agrícolas sintéticos e naturais sobre os aspectos fisiológicos das abelhas são escassas (Stankus 2014). A fisiologia do intestino médio desses animais é um ponto relevante a ser estudado, pois é onde ocorre a absorção dos nutrientes e a síntese e secreção de enzimas e hormônios (Gullan & Cranston 2012), assim, alterações nesse local pode prejudicar o desenvolvimento e o crescimento de insetos (Mordue (Luntz) & Nisbet 2000).

O sistema digestório dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, médio e posterior, o trato digestivo configura uma barreira física eficiente no controle de agentes externos patogênicos ingeridos na alimentação (Levy et al. 2004, Gullan & Cranston 2012). O canal alimentar permite o contato destes artrópodes com o ambiente externo, assim, trabalhos que compreendam a ação de inseticidas em sua fisiologia têm sido de interesse em pesquisas que objetivam o controle de pragas (Levy et al. 2004, Chapman 2013), contudo o convívio com esses compostos não se limita a estes indivíduos, há necessidade de mais pesquisas que abranjam o ecossistema que essas pragas estão inseridas e assim esclarecer as espécies que são atingidos por esses produtos, entre eles as abelhas.

Como os outros animais, os insetos dependem dos constituintes nutricionais para seu desenvolvimento e reprodução, garantindo seu estabelecimento no meio ambiente. As proteínas expressam funções estruturais, enzimáticas e na síntese de hormônios, já os lipídios são fontes fundamentais de reserva energética, apresentam funções estruturais e metabólicas, os carboidratos

são fontes energéticas essenciais que podem ser convertidos em lipídios e participar da síntese de aminoácidos, o glicogênio é outro carboidrato alojado no corpo gorduroso, nos músculos, intestino e outros tecidos. Assim, quaisquer alterações nesses nutrientes podem ocasionar efeitos negativos na história de vida desses organismos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Gillott 2005, Klowden 2007, Chapman 2013).

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar as possíveis alterações fisiológicas (histofisiologia e histoquímica) no intestino médio das abelhas, e consequentemente as modificações nutricionais em *A. mellifera* tratadas com o inseticida/acaricida/nematicida azadiractina (Azamax®) e o composto limoneno em comparação aos produtos sintéticos inseticida lambda-cialotrina (Karate Zeon® 50 cs) e o herbicida glifosato (Roundup®). A dissertação foi dividida em quatro capítulos, onde o capítulo 1 é constituído pela introdução geral, e permite que o leitor tenha uma visão geral sobre o tema abordado como também apresenta o objetivo geral do estudo. O capítulo 2 contém o capítulo de livro **“Consequências do uso excessivo de defensivos agrícolas em abelhas: uma das prováveis causas do CCD”** publicado pela editora Atena Editora, sob ISBN 978-65-5983-042-8 e DOI: 10.22533/at.ed.42821100514, em que foi produzida uma revisão de literatura sobre a relação dos defensivos agrícolas com o declínio das abelhas, em especial sua correlação com o CCD. No capítulo 3 é mostrado o artigo **“Toxicologia, alterações histofisiológicas e nutricionais em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submetidas ao composto limoneno e a inseticida botânico em comparação a inseticida sintético e herbicida”**, submetido à revista Journal of Apicultural Research, no qual é apresentada uma análise comparativa da fisiologia do sistema digestório de abelhas *A. mellifera* tratadas com defensivos agrícolas naturais e sintéticos. Por fim, no capítulo 4 é realizada uma síntese a respeito das considerações finais deste trabalho.

Literatura Citada

- Aggarwal, K.K., S.P.S. Khanuja, A. Ahmad, T.R. Santha Kumar, V.K. Gupta & S. Kumar. 2002.** Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Fragrance J.* 17: 59–63.
- Aizen, M.A., J.C. Biesmeijer, D.J. Martins, K. Goka, D.W. Inouye, C. Jung, R. Medel, A. Pauw, R. Paxton, & C. Seymour. 2016.** Chapter 3: The status and trends in pollinators and pollination, p. 151-203. In S.G. Potts, V.L. Imperatriz-Fonseca & H.T. Ngo (eds.), IPBES (2016): The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Bonn, Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 556p.
- AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários). 2022.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 14/01/2022.
- Alves, T.J.S, G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotech. Histochem.* 1: 1-11.
- Araújo, M.J.C., C.A.G. Câmara, F.S. Born, M.M. Moraes, C.A. Badji & C.A.G. Camara. 2012.** Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 57: 139-155.
- Barbosa, A.L., F.M. Pereira, J.M.V. Neto, J.G.S. Rego, M.T.R. Lopes & R.C.R. Camargo. 2007.** Criação de abelhas (apicultura). Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 113p.
- Battaglin, W.A., D.W. Kolpin, E.A. Scribner, K.M. Kuivila & M.W. Sandstrom. 2005.** Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *J. Am. Water Res. Assoc.* 41:323–332.
- Born, F.S., E.M. Bianco, C.A.G. Camara C.A.G. 2012.** Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds collected in Pernambuco, Brazil. *Nat. Prod. Commun.* 7: 463-466.
- Bryden, J., R. Gill, R.A.A. Mitton, E.N. Raine & V.A.A. Jansen. 2013.** Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 16: 1463-1469.
- Buchmann, S.L. & G.P. Nabhan. 1996.** The forgotten pollinators. Covelho, Island Press, 292p.
- Camara, C.A.G., Y. Akhtar, M.B. Isman, R.C. Seffrin & F.S. Born. 2015.** Repellent activity of essential oils from two species of *Citrus* against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. *Crop Prot.* 74: 110.
- Camargo, R.C.R., F.M. Pereira & M.T.R. Lopes. 2002.** Produção de mel. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 138p. (Sistema de Produção 3).

- Cassier, P. & M. Papillon. 1991.** Ultrastructural studies of the in vitro chitin and cuticle secretions in the wing pads of *Locusta*. Can. J. Zool. 69:29-38.
- Chaplin-Kramer, R., E. Dombeck, J. Gerber, K.A. Knuth, N.D. Mueller, M. Mueller, G. Ziv & A.M. Klein. 2014.** Global malnutrition overlaps with pollinator-dependent micronutrient production. Proc. R. Soc. B. 281: 20141799. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1799>
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chopra, K., R. Leemans, P. Kumar, H. Simmons & R. Meenakshi R. 2005.** Millennium Ecosystem Assessment. Policy responses. Washington, Island Press, 621p.
- Ciriminna, R., M. Lomeli-Rodriguez, P.D. Carà, J.A. Lopez-Sanchez & M. Pagliaro. 2014.** Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. Chem. Commun. 50: 15288-15296.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 109: 660-666.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and their combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biol. Interact. 263: 74-80.
- Dill, G.M., R.D. Sammons, P.C.C. Feng, F. Kohn, K. Kretzmer, A. Mehrsheikh, M. Bleeker, J.L. Honegger, D. Farmer, D. Wright & E.A. Hauptfear. 2010.** Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: V.K. Nandula (Ed.), glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management. Hoboken, Wiley, pp. 1–33.
- Eardley, C., B.M. Freitas, P.G. Kevan, R. Rader, M. Gikungu, A.M. Klein, C. Maus, V. Meléndez Ramírez, L.M. Singh Palni, C.H. Vergara, & S. Wiantoro. 2016.** Chapter 1 Background to pollinators, pollination and food production, p. 1-25. In S.G. Potts, V.L. Imperatriz-Fonseca & H.T. Ngo (eds.), The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Bonn, Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 556p.
- Eilers, E.J., C. Kremen, S. Greenleaf, A.K. Garber & A.M. Klein. 2011.** Contribution of pollinator-mediated crops to nutrients in the human food supply. PLoS ONE 6: e21363. DOI: [10.1371/journal.pone.0021363](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021363)
- Elberling, H. & J.M. Olesen. 1999.** The structure of a high latitude plant-flower visitor system: the dominance of flies. ECOGEG 22: 314–323.

- Evans, S.C., E.M. Shaw & A.L. Rypstra. 2010.** Exposure to a glyphosatebased herbicide affects agrobiont predatory arthropod behaviour and long-term survival. *Ecotoxicology*. 19: 1249-1257.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002.** Non-wood forest products from temperate broad-leaved trees. Roma, Media Center-FAO. Disponível em www.fao.org. Acesso em 26/05/2020.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2022.** FaoStat. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 18/01/2022.
- Ferrarini, S.R., M.O. Duarte, R.G. Rosa, V. Rolim, V.L. Eifler-Lima, G. Von Poser & V.L. Ribeiro. 2008.** Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 157: 149-153.
- Garcia, R.C. & R.H.N. Couto. 2005.** Produção de geléia real por abelhas *Apis mellifera* italianas, africanizadas e descendentes de seus cruzamentos. *Acta Sci. Anim. Sci.* 27: 17-22.
- Giarratana, F., D. Muscolino, C. Beninati, G. Ziino, A. Giuffrida & A. Panebianco. 2016.** Activity of R(+) limonene on the maximum growth rate of fish spoilage organisms and related effects on shelf-life prolongation of fresh gilthead sea bream fillets. *Int. J. Food Microbiol.* 237: 109–113.
- Giarratana, F., D. Muscolino, F. Panebianco, A. Patania, C. Benianti, G. Ziino, A. Giuffrida. 2015.** Activity of R(+) limonene against *Anisakis* larvae. *Ital. J. Food Saf.* 4: 209–211.
- Gillott, C. 2005.** *Entomology*. Dordrecht, Springer, 834p.
- Godfray, H.C.J., T. Blacquièrre, L.M. Field, R.S. Hails, G. Petrokofsky, S.G. Potts, N.E. Raine, A.J. Vanbergen & A.R. McLean. 2014.** A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc. Royal Soc. B* 281: 20140558. DOI: 10.1098/rspb.2014.0558
- Graystock, P., K. Yates, S.E.F. Evison, B. Darvill, D. Goulson & W.O.H. Hughes. 2013.** The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *J. Appl. Ecol.* 50:1207-1215.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 494p.
- Hirota, R., N.N. Roger, H. Nakamura, H.-S. Song, M. Sawamura & N. Suganuma. 2010.** Antiinflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *J. Food Sci.* 75: 87–92.
- Hollingsworth, R.G. 2005.** Limonene, a *Citrus* extract, for control of mealybugs and scale insects. *J. Econ. Entomol.* 98: 772–779.

- Hu, S., D.L. Dilcher, D.M. Jarzen & D. Winship Taylor. 2008.** Early steps of angiosperm–pollinator coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 240-245.
- Ibrahim, M.A., K. Pirjo, A. Aflatuni, K. Tiilikkala & J.K. Holopainen. 2001.** Insectidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agr. Food Sci. in Finland.* 10: 243-259.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Jones, D.K., J.I. Hammond & R.A. Relyea. 2011.** Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 30: 446–454.
- Jull, A.B., N. Cullum, J.C. Dumville, M.J. Westby, S. Deshpande & N. Walker. 2015.** Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst. Rev* 3: CD005083. DOI: 10.1002/14651858.CD005083.pub4
- Kevan, P.G. 2007.** Bees, biology and management. Cambridge, Enviroquest Ltd., 345p.
- Kevan, P.G. & H.G. Baker. 1983.** Insects as flower visitors and pollinators. *Annu. Rev. Entomol.* 28: 407-453.
- Kevan, P.G. & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2002.** Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 313p.
- Klein, A.M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen & T. Tscharntke. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* 274: 303-313.
- Klowden, M.J. 2007.** Physiological systems in insects. New York, Academic Press, 668p.
- Kovács-Hostyánszki, A., J. Li, J. Pettis, J. Settele, T. Aneni, A. Espíndola, S. Kahono, H. Szentgyörgyi, H. Thompson, A.J. Vanbergen & R. Vandame. 2016.** Chapter 2: Drivers of change of pollinators, pollination networks and pollination. In S.G. Potts, V.L. Imperatriz-Fonseca & H.T. Ngo (eds.), IPBES (2016): The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Bonn, Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 556p.
- Krell, R. 1996.** Value-added products from bee-keeping. Rome, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (Agricultural Services Bulletin 124). Disponível em <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm#con>. Acesso em 19/01/2022.
- Larson, B.M.H., P.G. Kevan & D.W. Inouye. 2001.** Flies and flowers: taxonomic diversity of anthophiles and pollinators. *Can. Entomol.* 133: 439-465.

- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Bio.* 64: 633-638.
- Martinez, S. & H.F. Van Emden H.F. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113–125.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. J. Nisbet. 2000.** “Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects”. *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 615–632.
- Mordue A.J., E.D. Morgan & A.J. Nisbet 2010.** Azadirachtin, a natural product in insect control. In: *Insect Control: Biological and synthetic agents* (eds L.I. Gilbert & S.S. Gill), Elsevier, Academic Press, pp. 185–203.
- Morse, R. & N. Calderone. 2000.** The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture* 128: 1-15.
- Nascimento, A.F., C.A.G. Camara & M.M. Moraes. 2012.** Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. *Nat. Prod. Commun.* 7: 129-132.
- Nerio, L.S, J.O. Verbel & E. Stachenko. 2010.** Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour. Technol.* 101: 372-378.
- NHB (National Honey Board). 1998.** Disponível em: www.nhb.org. Acesso em: 26/05/2020.
- Oliveira, T.R.S., C.A.G. Camara & V. Loges. 2015.** Postharvest durability of *Heliconia bihai* flower stem treated with essential oils for insect control. *Acta Hort.* 1060: 229-234.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociência.* 11: 195-205.
- Oliveira, F.M., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, C.T.S. Silva, K.A. Dutra, H.N. Costa, V.A.A. Braga, E.J. Silva, C.A. Guedes, T.J.S. Alves & A.A.C. Teixeira. 2021.** Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L. larvae (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 221: 105987. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105987>
- Olivo, C.J., N.M. Carvalho, J.H.S. Silva, F.F. Vogel, P. Massariol, G. Meinerzy, C. Agnolin, A.F. Morel & L.V. Viau. 2008.** Citronella oil on the control of cattle ticks *Cienc. Rural.* 38: 406-410.
- Pires, T.C.M., M.G.T.C. Ribeiro & A.A.S.C. Machado. 2018.** Extração do R-(+)-Limoneno a partir das cascas de laranja: avaliação e otimização da verduza dos processos de extração tradicionais. *Quim. Nova* 41: 355-365.

- Proctor, M.C.F., P. Yeo & A. Lack. 1996.** The natural history of pollination. Portland, Timber Press, 479p.
- Relyea, R.A. 2005.** The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol. Appl.* 15: 1118–1124.
- Ricketts, T.H., J. Regetz, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningha, C. Kremen, A. Bogdanski, B. Gemmill-Herren, S.S. Greenleaf, A.M. Klein, M.M. Mayfield, L.A. Morandin, A. Ochieng & B.F. Viana. 2008.** Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.* 11: 499-515.
- Roy, A. & S. Saraf. 2006.** Limonoids: overview of significant bioactive triterpenos distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 191-201.
- Ruiz-Toledo, J. & D. Sánchez-Guillén. 2014.** Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta Zool. Mex.* 30: 408-413.
- Schuette, J. 1998.** Environmental fate of glyphosate. Sacramento, Environ. Monit. Pest. Manag. Dep. Pestic. Regul. 13p.
- Scoble, M.J. 1995.** The Lepidoptera: form, function and diversity. Oxford, University Press, 404p.
- Senra, T.O.S., V. Zeringóta, C.M.O. Monteiro, F. Calmon, R. Maturano, G.A. Gomes, A. Faza, M.G. Carvalho & E. Dacmon. 2013.** Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)- cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvea of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 112: 1461-1466.
- Silva F.A.C. & S.S. Martinez. 2004.** Effect of neem seed oil aqueous solutions on survival and development of the predator *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Neotrop. Entomol.* 33, 1–9.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, F.M Cunha & A.A.C. Teixeira. 2020.** Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. *Austral Entomol.* 59: 215-224.
- Smith, M.R., G.M. Singh, D. Mozaffarian & S.S. Myers. 2015.** Effects of decreases of animal pollinators on human nutrition and global health: a modelling analysis. *Lancet* 386: 1964-1972.
- Southwick, E.E. & L. Jr. Southwick. 1992.** Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *J. Econ. Entomol.* 85: 621-633.
- Stankus, T. 2014.** Reviews of science for science librarians: an update on honeybee colony collapse disorder. *Sci. Tech. Libraries.* 33: 228-260.

- Tak, J.H., E. Jovel & M.B. Isman. 2015.** Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Manag. Sci.* 71: 329-336.
- Thomas, M.C. & D.R. Schumann. 1992.** Seeing the forest instead of the trees - Income opportunities in special forest products. Kansas City, Midwest Research Institute.
- Thompson H.M. & D. Thorbahn. 2009.** Review of honeybee pesticide poisoning incidents in Europe— evaluation of the hazard quotient approach for risk assessment. *Kühn-Archiv* 423: 103-108.
- Umpiérrez, M.L., J. Paullierb, M. Porrinic, M. Garridoc, E. Santosd & C. Rossinia. 2017.** Potential botanical pesticides from Asteraceae essential oils for tomato production: activity against whiteflies, plants and bees. *Ind. Crop. Prod.* 109: 686–692.
- VanEngelsdorp, D., R. Underwood, D. Caron, J.Jr. Hayes. 2007.** An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.* 147: 599–603.
- VanEngelsdorp, D., J.Jr. Hayes, R.M. Underwood, J. Pettis. 2008.** A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One.* 3: 1-6, e4071.
- Vidal, M.F. 2019.** Evolução da produção de mel na área de atuação do BNB. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, 1-7. (Caderno Setorial 62).
- Viegas Jr., C. 2003.** Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova.* 26: 390-400.
- Wang S.Y. & G.K. Wang. 2003.** Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell. Signal.* 15: 151-159.
- Willmer, P. 2011.** Pollination and floral ecology. Princeton, Princeton University Press, 832p.

CAPÍTULO 2

CONSEQUÊNCIAS DO USO EXCESSIVO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS EM
ABELHAS: UMA DAS PROVÁVEIS CAUSAS DO CCD¹

Catiane O. Souza¹, Valéria W. Teixeira², Álvaro A. C. Teixeira², Glaucilane S. Cruz¹,
Carolina A. Guedes¹, Júlio C. S. Nascimento³ & Camila S. Teixeira¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Recife, Brasil.

³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹Souza, C.O., V.W. Teixeira, A.A.C. Teixeira, G.S. Cruz, C.A. Guedes, J.C.S. Nascimento, C.S. Teixeira. Consequências do uso excessivo de defensivos agrícolas em abelhas: uma das prováveis causas do CCD. In: Meio ambiente: enfoque socioambiental e interdisciplinar. Atena Editora.

RESUMO - O desaparecimento das abelhas é um fenômeno observado pelo mundo, sendo o distúrbio do colapso das colônias (Colony Collapse Disorder-CCD) apontado como a causa desse fato que possui impacto ecológico, econômico e social, pois as abelhas possuem papel essencial na polinização de espécies vegetais naturais e de importância agrícola, além disso, tem-se a produção de mel e outros produtos provenientes da apicultura. Múltiplas causas são apontadas como responsáveis por esse distúrbio, sendo que elas agem de forma simultânea. Por isso este trabalho tem por objetivo identificar os impactos causados pelo uso excessivo de defensivos agrícolas, que é apontado como um dos motivos do CCD. Para tal, foi realizada uma revisão de literatura no período entre Dezembro de 2020 a Março de 2021, onde foram utilizados livros e artigos científicos para pesquisa bibliográfica, os artigos foram selecionados por meio dos bancos de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO), Pubmed, Science Direct e Google acadêmico. Como conclusão, as pesquisas que analisam o efeito de defensivos agrícolas sobre o declínio, geralmente abordam os efeitos dos neonicotinoides, embora se tenha relatos dos prejuízos que podem ser causados por inseticidas de grupos químicos diferentes, além do herbicida glifosato.

PALAVRAS-CHAVE: Polinizadores, *Apis mellifera*, declínio de polinizadores, agrotóxicos

CONSEQUENCES OF THE EXCESSIVE USE OF AGRICULTURAL DEFENSIVES IN BEES: ONE OF THE PROBABLE CAUSES OF CCD

ABSTRACT – The disappearance of bees is a phenomenon observed by the world, with the colony collapse disorder (Colony Collapse Disorder-CCD) being pointed out as the cause of this fact that has an ecological, economic and social impact, as bees have an essential role in the pollination of species natural vegetables of agricultural importance, in addition, there is the production of honey and other products from beekeeping. Multiple causes are said to be responsible for this disorder, and they act simultaneously. Therefore, this work aims to identify the impacts caused by the excessive use of pesticides, which is pointed out as one of the reasons for the CCD. To this end, a literature review was carried out from December 2020 to March 2021, where books and scientific articles were used for bibliographic research, the articles were selected through the Scientific Electronic Library Online (SciELO), Pubmed databases, Science Direct and Google Scholar. In conclusion, research that analyzes the effect of pesticides on decline generally addresses the effects of neonicotinoids, although there are reports of damage that can be caused by insecticides from different Chemical groups, in addition to the herbicide glyphosate.

KEY WORDS: Pollinators, *Apis mellifera*, pollinator decline, pesticides

Introdução

A polinização cumpre um papel importante no ecossistema no que se refere a continuidade da diversidade genética de espécies de plantas e sua reprodução, além disso é essencial para cultivos de interesse humano, considerando que cerca de 80% das espécies naturais e 75% das espécies agrícolas que possuem flores são inerentes à polinização animal, sendo as abelhas que produzem mel, o polinizador mais notável economicamente (Gallai et al. 2009).

A abelha *Apis mellifera* (Linnaeus), ordem Hymenoptera e família Apidae, está associada a humanidade há cerca de sete mil anos (Bloch et al. 2010). Foi a primeira espécie a ser utilizada para polinização dos campos agrícolas do mundo, logo, entre as produtoras de mel as do gênero *Apis* são as mais difundidas e com ampla domesticação em todos os continentes (Camargo et al. 2002, Leclercq et al. 2018).

Originou-se inicialmente na África, entretanto, em momentos anteriores a chegada do *Homo sapiens*, a ocorrência de dois eventos não relacionados provocou a migração delas para o norte da Ásia Central e o norte europeu (Whitfield et al. 2006), como consequência pelo menos duas dúzias de subespécies surgiram, essas se diferenciavam na morfologia, fisiologia e comportamento (Ruttner 1988).

Sendo introduzida no Brasil no período colonial pelos padres Jesuitas, anos após, a subespécie africana *Apis mellifera scutellata* (Lepeletier) chegou ao país em 1956 e causou a intensa variabilidade e hibridização que se tem hoje (Diniz-Filho & Malaspina 1995). Historicamente a domesticação das abelhas no país foi influenciada pelas diferentes sociedades pós-colonização, se tornando uma tradição popular propagada especialmente nas regiões norte e nordeste do Brasil (Villas-Bôas 2012).

O Brasil se encontra na 11ª posição na escala mundial, com uma produção de 42.346 ton de mel no ano de 2018. O maior importador de mel do mundo são os Estados Unidos, em 2016 eles representaram 21 % das compras mundiais. No Brasil, o nordeste tem uma alta competitividade no cenário mundial por conta de peculiaridades da produção na região, em que o mel é em sua maioria proveniente de vegetação nativa e as condições ambientais que previnem doenças diminuindo o uso de pesticidas. O mel orgânico brasileiro por sua vez recebe uma ótima remuneração pelos EUA, sendo o Brasil um dos principais exportadores (Vidal 2019, FAO 2020).

Assim, este trabalho objetivou identificar os impactos causados pelo uso excessivo de defensivos agrícolas sobre as abelhas *A. mellifera*, que é apontado como um dos motivos do distúrbio do colapso das colônias (CCD).

Material e Métodos

Foi executada uma revisão de literatura a partir de base de dados nacionais e estrangeiras, a busca foi realizada no período de Dezembro de 2020 a Março de 2021. A pesquisa bibliográfica foi feita através de livros e artigos científicos escolhidos em banco de dados, sendo eles: Scientific Electronic Library Online (SciELO), Pubmed, Science Direct e Google acadêmico. Os assuntos buscados foram o histórico e biologia de *Apis mellifera* (Linnaeus), além do efeito de defensivos agrícolas sobre a *A. mellifera* e agrotóxicos como causadores do CCD (Colony Collapse Disorder). O levantamento bibliográfico procedeu-se por meio de um recorte temporal entre os anos de 1988 a 2020.

Biologia da abelha *Apis mellifera*

Seu corpo é dividido em três segmentos: cabeça, tórax e abdômen. Possui ainda a quitina (promove resistência), esclerotina (promove rigidez), resilina (promove flexibilidade) e cera

(promove impermeabilidade) como partes não vivas. Na cabeça se encontram os olhos simples e compostos, ou seja, ocelos e omatídeos respectivamente, nesta região se localizam também as antenas, aparelho bucal e internamente as glândulas (Domingos et al. 2016). Os dois últimos são de extrema importância para seu desempenho.

As abelhas dispõem de peças bucais do tipo mastigador e lambedor. Nas *A. mellifera* as glossas labiais são alongadas e se fundem formando uma língua peluda, esta é contornada por gáleas maxilares e palpos labiais que configuram uma probóscide tubular que detém o canal alimentar. Durante a alimentação, a língua é imergida no mel ou néctar e ficam aderidos aos pêlos, posteriormente a língua é recolhida e o líquido aderido é carregado para o espaço entre as gáleas e os palpos labiais (Gullan & Cranston 2017).

As mandíbulas são esclerotizadas com formato de colher e se localizam na base da probóscide, tem a função de manipular a cera e resinas vegetais para a criação do ninho, de alimentar as larvas e a rainha, de limpeza, em lutas, e na remoção de resíduos do ninho (Gullan & Cranston 2017). As glândulas mandibulares e hipofaríngeas constituem o sistema salivar e estão presentes de modo funcional apenas nos adultos com formação na fase de pupação. As glândulas salivares larvais são formadas na fase embrionária com um par de invaginação da ectoderme, ao fim do estágio larval as mesmas se degeneram e os dutos irão originar as glândulas salivares adultas (Cruz-Landim 2009).

Já as glândulas de Dufour são decorrentes de uma evaginação da parede do oviduto na sua fração basal, possui a forma de um tubo ou saco, e estão presentes somente nas rainhas (Cruz-Landim 2009).

A diferença morfo-anatômica entre a rainha *A. mellifera* e suas operárias está no seu tamanho. Ela conta com um abdômen mais alongado com sete segmentos conspícuos, que acomoda a maioria dos órgãos e algumas glândulas (Tautz 2010). Como a rainha cumpre o papel de reprodução da colmeia seu ovário é desenvolvido, e possui uma espermateca, órgão esférico incumbido de receber

e armazenar os espermatozoides adquiridos durante a cópula para utiliza-los para fertilização dos ovócitos, com capacidade em torno de 7 milhões de espermatozóides (Cruz-Landim 2009, Domingos et al. 2016).

Seus ovários são do tipo meroísticos e politróficos, e ovaríolos com número e comprimento variáveis. Só duas regiões podem ser identificadas nos ovaríolos quando as rainhas são virgens, sendo a região do filamento terminal (suspensor dos ovários) e do germário (onde acontece a diferenciação do ovócito). As células germinativas estão presentes no germário, e os folículos do vitelário são dispostos linearmente. A constituição de cada folículo se dá pela câmara nutridora e câmara ovocítica, sendo elas revestidas por uma única camada de células foliculares (Martins & Serrão 2004, Cruz-Landim 2009).

De Souza (2009) estudando rainhas africanizadas percebeu que elas saem de suas colmeias para acasalar em média 4 a 5 dias após sua emergência. Os voos são feitos no período da tarde, onde são realizados entre 2 e 4 voos de reconhecimento seguindo, posteriormente, para as áreas em que os zangões estão agrupados. Os zangões que conseguem copular irão morrer rapidamente, isto porque seus órgãos genitais irão se prender no corpo da rainha. O acasalamento acontece em pleno voo, por volta de 10-20 m de altura, e a rainha irá copular até encher a sua espermateca, sendo necessário cerca de 6 a 8 zangões. O sêmen coletado ao longo do voo nupcial será o mesmo durante toda a vida da rainha (Domingos et al. 2016).

Quanto a estrutura social, abelhas do gênero *Apis* são organizadas em rainha (responsável pela reprodução); aproximadamente 400 zangões (nascem de ovos não fecundados) que tem a função de fecundar uma rainha virgem; e 60.000 abelhas operárias (nascem de ovos fecundados) que são encarregadas de todos os trabalhos dentro como também fora da colmeia (Camargo et al. 2002, Domingos et al. 2016).

Impacto de defensivos agrícolas em abelhas *Apis mellifera*

A perda de insetos polinizadores é evidenciada por diversos casos documentados na América do Norte e Europa, porém a redução na população desses animais é representada em escala global (Potts et al. 2010). Muitos estudos atribuem o desaparecimento de colônias ao distúrbio do colapso das colônias (Colony Collapse Disorder CCD ou Honeybee Colony Collapse Disorder-HCCD) (Stankus 2014). O CCD está vinculado a um conjunto de sintomas, e são eles, a perda das abelhas operárias sem razão aparente que se sobressai pelo enfraquecimento ou morte das colônias que possuem excedente de crias quando comparadas a população de abelhas adultas, ausência de abelhas operárias mortas dentro ou em volta da colmeia, e invasão mais tardia de pragas como traças e besouros pequenos (Cox-Foster et al. 2007).

Múltiplas causas são apontadas como responsáveis por esse distúrbio, entre elas estão a perda e fragmentação de habitat (Hendrickx et al. 2007), mudanças climáticas (Hegland et al. 2009), introdução de espécies exóticas e competição por recursos (Stout & Morales 2009), doenças patogênicas (Cox-Foster et al. 2007), aumento do uso de produtos químicos na agricultura, como inseticidas (Rortais et al. 2005). Esses fatores agem de forma simultânea (Stankus 2014), portanto, um único fator ou agente patogênico não é capaz de iniciar o CCD, mas sim a interação entre eles.

A maioria dos trabalhos que envolvem inseticidas e explicações ao CCD abordam principalmente as consequências dos neonicotinoides, algumas teorias sugerem que inseticidas desse grupo químico podem interferir na capacidade cognitiva dos indivíduos (Stankus 2014), todavia, produtos do grupo piretróide podem ser tão prejudiciais quanto os neonicotinoides a abelhas (Charreton et al. 2015), e apresentam valores de doses letais moderadamente mais elevados (Oliver 2015).

Os piretróides são neurotóxicos e possuem uma quantidade substancial de ingredientes ativos registrados e são recomendados como controle para várias pragas em diversas culturas (AGROFIT

2020). Frizzas et al. (2017) demonstraram recentemente que os químicos lufenurom (benzoiluréia) e lambda-cialotrina (piretróide) podem exercer impactos negativos em uma diversidade de espécies, dentre elas a *A. mellifera*.

Durante o forrageamento as abelhas podem entrar em contato com os resíduos dos defensivos agrícolas (Potts et al. 2010), as hipóteses levantadas indicam que os inseticidas causam a morte das abelhas por intoxicação (Alston et al. 2007), já os herbicidas agem de forma indireta ao reduzir a fonte de alimentação, nesse contexto as flores (pólen e néctar), das polinizadoras (Holzschuh et al. 2008). Esses resíduos foram também encontrados nas colmeias, o que significa que a contaminação não se restringe a forragem, mas que as abelhas estão expostas constantemente a doses com efeitos ainda desconhecidos (Mullin et al. 2010).

O glifosato [N- (fosfonometil) -glicina] é um herbicida não seletivo e sistêmico. Ele pode apresentar sinergismo com inseticidas, como o clorpirifós, que gera aumento na sua toxicidade, cujos os danos sobre os insetos polinizadores ainda não são conhecidos e precisam ser elucidados, pois, as abelhas convivem com essas pressões ambientais a todo momento e elas podem ser afetadas indiretamente por meio de uma redução na quantidade de flores, ou mesmo, terem um contágio através do contato com água, pólen ou néctar contaminado com o resíduo (Ruiz-Toledo & Sánchez-Guillén 2014).

Gregorc & Ellis (2011) testaram inseticidas sintéticos, fungicidas e herbicidas, contendo piretróide e glifosato entre eles, sobre a fisiologia do intestino médio de larvas de *Apis mellifera*, esta região é alvo de estudo por agir como barreira de defesa, age também na absorção de nutrientes e interação com diversos inseticidas, e foi observado o aumento da apoptose (morte celular) nas larvas que foram tratadas em comparação a resposta das que não houve tratamento.

Diante do exposto é possível concluir que a proteção das abelhas se torna essencial para segurança alimentar da população e os relatos de seu desaparecimento pelo mundo se tornam

preocupantes. Os produtos aqui apontados podem contribuir para o CCD e merecem maior atenção pelas pesquisas, pois os estudos até o momento abrangem, em sua maioria, os neonicotinoides.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora.

Literatura Citada

- AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários).** 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 20/12/2020.
- Alston, D.G., V.J. Tepedino, B.A. Bradley, T.R. Toler, T.L. Griswold & S.M. Messinger.** 2007. Effects of the insecticide Phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environ. Entomol.* 36: 811-816.
- Bloch, G., T.M. Francoy, I. Wachtel, N. Panitz-Cohen, S. Fuchs & A. Mazar.** 2010. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 11240-11244.
- Camargo, R.C.R., F.M. Pereira & M.T.R. Lopes.** 2002. Produção de mel. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 138p. (Sistema de Produção 3).
- Charreton, M., A. Decourtye, M. Henry, G. Rodet, J.C. Sandoz, P. Charnet & C. Collet.** 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PLoS One.* 10: 1-14, e0144879.
- Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P-Lan. Quan, T. Briesse, M. Horning, D.M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis & W.I. Lipkin.** 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318: 283-286.
- Cruz-Landim, C.** 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo, UNESP, 1286p.
- De Souza, D.** 2009. Aspectos reprodutivos de rainhas africanizadas (*Apis mellifera* L): influência do peso ao nascer no desempenho da colônia. Dissertação de Mestrado, USP, Ribeirão Preto, 111p.

- Diniz-Filho, J.A.F. & O. Malaspina. 1995.** Evolution and population structure of africanized honey bee in Brazil: evidence from spatial analysis of morphometrical data. *Evolution*. 49: 1172-1179.
- Domingos, A.T.S., M.M. Nóbrega & R.A. Silva. 2016.** Biologia das abelhas *Apis mellifera*: Uma revisão bibliográfica. *Acta Api. Bra.* 04: 08-12.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020.** FaoStat. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 13/12/2020.
- Frizzas, M. R., C.M Oliveira & C. Omoto. 2017.** Diversity of insects under the effect of Bt maize and insecticides. *Arq. Inst. Biol.* 84: 1-8, e0062015.
- Gallai, N., J.M. Salles, J. Settele & B.E. Vaissière. 2009.** Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ.* 68: 810-821.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 200-207.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2017.** Insetos: fundamentos da entomologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 460p.
- Hegland, S.J., A. Nielsen, A. Lázaro, A.L. Bjerknes & O. Totland. 2009.** How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecol. Lett.* 12: 184–195.
- Hendrickx, F., J.-P. Maelfait, W.V. Wingerden, O. Schweiger, M. Speelmans, S. Aviron, I. Augenstein, R. Billeter, D. Bailey, R. Bukacek, F. Burel, T. Diekötter, J. Dirksen, F. Herzog J. Liira, M. Roubalova, V. Vandomme & R. Bugter. 2007.** How landscape structure, land-use intensity and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. *J. Appl. Ecol.* 44: 340–351.
- Holzschuh, A., I. Steffan-Dewenter & T. Tscharntke. 2008.** Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos* 117: 354–361.
- Leclercq, G., N. Gengler & F. Francis. 2018.** How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. *Entomol. Faun. - faunistic entomology.* 71: 1-13.
- Martins, G.F. & J.E. Serrão. 2004.** A comparative study of the ovaries in some Brazilian bees (Hymenoptera; Apoidea). *MZUSP* 44: 45-53.
- Mullin, C.A., M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. Vanengelsdorp & J.S. Pettis. 2010.** High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5: 1-19, e9754.
- Oliver, C.J., S. Softley, S.M. Williamson, P.C. Stevenson & G.A. Wright. 2015.** Pyrethroids and nectar toxins have subtle effects on the motor function, grooming and wing fanning behaviour of honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One.* 10: 1-12, e0133733.

- Potts, S.G., J.C. Biesmeijer, C. Kremen, P.N.O. Schweiger & W.E. Kunin. 2010.** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25: 345-353.
- Rortais, A., G. Arnolda, M.-P. Halmb & F. Touffet-Briens. 2005.** Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and néctar consumed by different categories of bees. *Apidologie.* 36, 71–83.
- Ruiz-Toledo, J. & D. Sánchez-Guillén. 2014.** Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honey bee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta Zool. Mex.* 30: 408-413.
- Ruttner, F. 1988.** Biogeography and taxonomy of honeybees. New York, Springer, 284p.
- Stankus, T. 2014.** Reviews of science for science librarians: an update on honeybee colony collapse disorder. *Sci. Tech. Libraries.* 33: 228-260.
- Stout, J. & C.L. Morales. 2009.** Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie* 40: 388-409.
- Tautz, J. 2010.** O fenômeno das abelhas. Porto Alegre, Artmed, 288 p.
- Vidal, M.F. 2019.** Evolução da produção de mel na área de atuação do BNB. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, 1-7. (Caderno Setorial 62).
- Villas-Bôas, J. 2012.** Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão. Brasília, Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 96 p. (Série Manual Tecnológico).
- Whitfield, C.W., S.K. Behura, S.H. Berlocher, A.G. Clark, J.S. Johnston, W.S. Sheppard, D.R. Smith, A.V. Suarez, D. Weaver & N.D. Tsutsui. 2006.** Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642-645.

CAPÍTULO 3

TOXICOLOGIA, ALTERAÇÕES HISTOFISIOLOGICAS E NUTRICIONAIS EM *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) SUBMETIDAS AO COMPOSTO LIMONENO E A INSETICIDA BOTÂNICO EM COMPARAÇÃO A INSETICIDA SINTÉTICO E HERBICIDA¹

CATIANE O. SOUZA¹, VALÉRIA W. TEIXEIRA², GLAUCILANE S. CRUZ¹, CAROLINA A. GUEDES¹,
JÚLIO C. S. NASCIMENTO³ & ÁLVARO A. C. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Recife, Brasil.

³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹SOUZA, C.O., V.W. TEIXEIRA, G.S. CRUZ, C.A. GUEDES, J.C.S. NASCIMENTO & A.A.C. TEIXEIRA. Toxicologia, alterações histofisiológicas e nutricionais em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submetidas ao composto limoneno e a inseticida botânico em comparação a inseticida sintético e herbicida. Submetido à revista Journal of Apicultural Research.

RESUMO - Esta pesquisa objetivou comparar, a nível toxicológico, fisiológico e nutricional a atividade inseticida de defensivos químicos naturais em comparação ao sintético e um herbicida em *Apis mellifera*, e assim, agregar conhecimento sobre os impactos fisiológicos de produtos naturais sobre as abelhas verificando a segurança destes produtos. Foram realizados bioensaios de toxicidade para obtenção da CL₅₀ de cada produto testado através de análise de Probit. As concentrações CL₅₀ e razões de toxicidade (RT) obtidas foram Karate® (0,0134 µL/100 mL, 53.156 vezes) > Limoneno (1,44µL/100 mL, 494,64 vezes) > Glifosato (712,29 µL/100 mL). Não foi possível obter a CL₅₀ para Azamax®, pois concentrações acima de 250 µL/100 mL causaram repelência e abaixo, não promoveram mortalidades. As CL₅₀ e a concentração determinada para Azamax®, serviram como tratamento em análises histológicas e histoquímicas do intestino médio. Ensaio bioquímico também foram realizados. Embora o herbicida Glifosato tenha apresentado baixa toxicidade, ele e o composto Limoneno, foram às substâncias que mais interferiram nos parâmetros bioquímicos e causaram alterações histopatológicas nas células do intestino médio. O inseticida Karate® também levou a modificações histopatológicas nas células e redução das macromoléculas importantes utilizadas em funções bioquímicas. Apesar da repelência observada no inseticida botânico Azamax®, *A. mellifera* quando expostas a este inseticida, apresentaram alterações morfológicas nas células digestivas e na absorção de nutrientes. É concluído que os defensivos agrícolas naturais podem ser tão nocivos as abelhas quanto os sintéticos, podendo causar efeitos deletérios a fisiologia digestiva destes insetos o que poderá refletir na história de vida, principalmente em sua reprodução.

PALAVRAS-CHAVE: Declínio de Polinizadores, nutrição, defensivos agrícolas, histofisiologia digestiva, toxicidade

TOXICOLOGY, HISTOPHYSIOLOGICAL AND NUTRITIONAL CHANGES IN *Apis mellifera* (Hymenoptera: APidae) SUBMITTED TO LIMONENE COMPOUND AND BOTANICAL INSECTICIDE IN COMPARISON TO SYNTHETIC INSECTICIDE AND HERBICIDE

ABSTRACT – This work aimed to compare, at a toxicological, physiological and nutritional level, the insecticidal activity of natural chemical pesticides compared to the synthetic and herbicide in *Apis mellifera*, and thus, add knowledge about the physiological impacts of natural products on bees and verifying the safety of these products. Toxicity bioassays were carried out to obtain the LC₅₀ of each product tested through Probit analysis. The LC₅₀ concentrations and toxicity ratios (RT) obtained were Karate® (0.0134 µL/100 mL, 53,156 times) > Limonene (1.44 µL/100 mL, 494.64 times) > Glyphosate (712.29 µL/100 mL). It was not possible to obtain the LC₅₀ for Azamax®, as concentrations above 250 µL/100 mL caused repellency and below there were no mortalities. The LCs₅₀ and the concentration determined for Azamax®, served as treatment in histological and histochemical analyzes of the midgut. Biochemical assays were also performed. Although the herbicide Glyphosate showed low toxicity, it and the compound Limonene were the substances that most interfered in the biochemical parameters and caused histopathological changes in the midgut cells. Karate® insecticide also led to histopathological changes in cells and reduction of important macromolecules used in biochemical functions. Despite the repellency observed in the botanical insecticide Azamax®, *A. mellifera*, when exposed to this insecticide, presented morphological alterations in the digestive cells and in the absorption of nutrients. It is concluded that natural pesticides can be as harmful to honeybee as synthetics, and can cause deleterious effects on the digestive physiology of these insects reflecting on their life history, like their reproduction.

KEY WORDS: Decline of pollinators, nutrition, agricultural chemicals, digestive histophysiology, toxicity.

Introdução

As abelhas são os polinizadores mais importantes tanto em ecossistemas naturais como em campos agrícolas. Além da polinização, também são organismos que geram emprego e alimento ao fornecer produtos apícolas (mel, própolis, pólen, geleia real, etc). Economicamente, as abelhas domesticadas *Apis mellifera* (Linnaeus) se destacam, talvez devido a sua distribuição mundial atrelada a anos de domesticação (Barbosa et al. 2007, Leclercq 2018). Assim, uma colônia que esteja com a saúde ou habilidade de forragear comprometida pode impactar negativamente os serviços essenciais de polinização bem como a comercialização do mel e outros produtos apícolas (Potts et al. 2010, Tan et al. 2015).

Nos últimos anos tem sido relatado um fenômeno, denominado distúrbio do colapso das colônias (Colony Collapse Disorder-CCD ou Honeybee Colony Collapse Disorder-HCCD), na tentativa de explicar o desaparecimento das colônias que teve início na América do Norte e Europa (Potts et al. 2010, Stankus 2014). O CCD pode ser desencadeado a partir da interação simultânea de vários fatores estressores, como a perda e fragmentação do habitat, doenças patogênicas, mudanças climáticas, e contato com diversos defensivos químicos agrícolas (Hendrickx et al. 2007, Dormann et al. 2008, Neumann & Carreck 2010, Stankus 2014).

Assim, já foram relatados a presença de resíduos dos inseticidas piretróides e neonicotinóides e do herbicida glifosato no mel, como também em outros produtos gerados com a apicultura (Sgargi et al. 2020). O que demonstra que as abelhas estão em contato direto com esses defensivos sintéticos, que podem possuir ação deletéria sobre seu organismo (Tan et al. 2015, Frizzas et al. 2017, Ferreira et al. 2017, Luo et al. 2021), e por isso, estudos que buscam entender o impacto dessas substâncias nas abelhas são necessários, para assim, implementar um manejo de pragas seguro aos polinizadores.

Os inseticidas botânicos e/ou produtos naturais (óleo essencial, extrato vegetal ou composto isolado) foram bastante estudados nas últimas décadas quanto a sua toxicidade a insetos praga, que pode ser atribuída a ação inseticida, repelente, anti-alimentação, anti-oviposição, entre outros (Isman 2006, Isman 2020). Os vários mecanismos de ação dos produtos naturais refletem na diminuição do desenvolvimento de resistência nos insetos, e, na maioria dos casos, sua constituição química os classifica como seguros ao ecossistema em que estão sendo utilizados (Madbouly et al. 2015). Com isso, os produtos naturais podem ser uma boa alternativa ao uso indiscriminado de inseticidas sintéticos.

Os produtos naturais são considerados, em vários casos, seletivos a insetos benéficos, porém, as pesquisas de seletividade desses produtos sobre as abelhas se limitam muitas vezes a testes toxicológicos (Gashout & Guzmán-Novoa. 2009, Isman 2020, Brito et al. 2021), assim, existe uma carência de pesquisas sobre como eles podem afetar aspectos fisiológicos e nutricionais desses polinizadores e com isso refletir na reprodução.

As abelhas podem não apresentar toxicidade aguda a um composto (Umpiérrez et al. 2017), contudo, isso não significa que parâmetros fisiológicos e nutricionais não sejam comprometidos de formas diferentes; e em algumas vezes, levando a um dano celular irreversível. Muitos trabalhos já verificaram alterações histológicas no intestino, corpo gorduroso ou gônadas de insetos praga, provocadas por produtos naturais, que influenciaram negativamente na histoquímica, biologia, nutrição e reprodução destes organismos (Alves et al. 2013, Almeida et al. 2014, Cruz et al. 2016, Silva et al. 2017).

Diante do exposto, esta pesquisa pretende comparar a atividade inseticida de um composto isolado (Limoneno) e um inseticida botânico (Azamax[®]) com um inseticida (Lambda-Cialotrina) e um herbicida (Glifosato) sintéticos em abelhas *A. mellifera*, por meio de testes toxicológicos, da histologia e histoquímica do intestino médio e, consequentemente, seus impactos nutricionais no

organismo. Para assim, aumentar o conhecimento acerca dos impactos fisiológicos de produtos naturais sobre as abelhas e atestar, desta forma, práticas agrícolas seguras para estes animais.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fisiologia de Insetos (LAFI) e no Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados (LABEMOVI), ambos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção dos Insetos. As abelhas, *Apis mellifera*, foram obtidas através do apiário experimental do Departamento de Zootecnia da UFRPE. Recipientes plásticos com tampa perfurada foram manuseados na entrada das colmeias para realização das coletas de abelhas operárias. Em seguida, os insetos foram conduzidos ao LAFI e utilizados nos bioensaios.

Estabelecimento da Curva de Dose Resposta em *Apis mellifera*. Para obter a curva de dose resposta, as abelhas foram contaminadas via ingestão com concentrações dos inseticidas Karate Zeon® 50 cs (50 g/L i.a. LAMBDA-CIALOTRINA, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. – São Paulo/SP) e Azamax® (12 g/L i.a. AZADIRACTINA, UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A. – Ituverava/SP), cujas classificações de periculosidade ambiental são, respectivamente, classe II (muito perigoso ao meio ambiente) e classe IV (pouco perigoso ao meio ambiente); do herbicida Roundup® (445 g/L i.a. GLIFOSATO, Monsanto do Brasil LTDA - São Paulo/SP), classe III (perigoso ao meio ambiente); e com concentrações do composto Limoneno obtido comercialmente da Sigma Aldrich® com 98% de pureza.

Bioensaio de Toxicidade por Ingestão. Inicialmente, as concentrações utilizadas nos testes preliminares partiram de uma solução estoque produzida a partir da menor dose recomendada no rótulo do fabricante ajustada ao volume de 100 mL de solução (inseticida+ solução de mel (1:1) + dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 %). Para o limoneno, foram realizadas diluições do composto em 100

mL da mesma solução descrita acima. Os pré-testes tiveram o objetivo de definir uma faixa de concentração dos produtos capaz de causar mortalidades em torno de 5 e 95% nas amostras (abelhas), onde um pedaço de algodão embebido com a solução de mel + inseticida foi colocado em um recipiente plástico e recoberto com tecido PVC, este tipo de tecido permite a alimentação das abelhas sem que as mesmas permaneçam aderidas ao mel. Para o controle foi empregado apenas a solução de mel (1:1) + DMSO a 1%. Este recipiente com a solução dos produtos e o controle foi colocado em uma gaiola constituída por um tubo PVC (20 cm de altura e 15 cm de diâmetro) apoiado sobre um prato Vasart para vaso redondo e fechada com tecido voil. Cada gaiola constou de 15 abelhas adultas, sendo 2 gaiolas por concentração, totalizando 30 abelhas/concentração. As gaiolas eram mantidas em ambiente controlado (25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ UR), e a toxicidade aguda avaliada após 24 horas de exposição aos tratamentos. Com os resultados dos testes preliminares, foram determinadas as concentrações/tratamentos para o Karate®, Glifosato e Limoneno. Foi estabelecido como tratamento para os bioensaios subsequentes, as CL_{50} dos produtos e a concentração de 250 µL/100 mL de azadiractina, pois está foi a maior concentração dos produtos que levou a morte sem causar repelência nos insetos (concentrações superiores repeliram 100% dos indivíduos).

Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio de *Apis mellifera*. A contaminação ocorreu via ingestão do mel com as respectivas CL_{50} dos produtos e a concentração de 250 µL/100 mL de azadiractina, através do mesmo procedimento descrito acima. As concentrações letais (CL_{50}) utilizadas foram 0,0134 µL/mL, 712,29 e 1,44 para Lambda-Cialotrina, Glifosato e Limoneno, respectivamente. Para o tratamento com Azadiractina foi utilizada a concentração de 250 µL/ 100 mL, e o controle foi feito com a solução de mel (1:1) + DMSO a 1%. Após 24 h de exposição aos produtos e ao controle, as abelhas sobreviventes, foram imobilizadas em baixa temperatura (4° C), dissecadas com o auxílio de um estereoscópio, e os tubos digestivos foram fixados emformol a 10% por 24h e posteriormente armazenados em álcool 70%. Em seguida, os intestinos médios dos insetos

foram seccionados e desidratados em banhos crescentes de etanol (70–100%), por 10 minutos cada. As amostras foram então impregnadas em álcool + historesina (1:1) por 24h e finalmente incluídas em historesina pura (Leica®). Posteriormente, foram confeccionados cortes com espessura de 5 µm obtidos de um micrótomo Leica® RM 2035. Os cortes foram submetidos a técnicas de coloração com Azul de Toluidina para análise histológica. Para a análise histoquímica, utilizou-se o Ácido Periódico Schiff (P.A.S.) para a detecção de carboidratos neutros (Junqueira & Junqueira 1983), e Xylidine Ponceau para a detecção de proteína total (Pearse 1960). As lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica®, e as imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica LAS Image (Solomon 2009).

Quantificação de Pixels. A quantificação histoquímica de carboidratos neutros e proteínas totais foi realizada a partir dos pixels. As imagens capturadas foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP®2.8 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX) que converte as imagens digitais em tons de cinza (preto e branco). Esta segmentação de cores permite a medição do número de pixels no tecido selecionado (Solomon 2009). Foram utilizadas três lâminas de insetos diferentes para cada tratamento, onde foram avaliadas quatro seções, totalizando 12 seções/tratamento.

Ensaio Bioquímicos. Para extração e quantificação das proteínas solúveis totais, lipídios, açúcar total e glicogênio, as abelhas foram previamente expostas a CL₅₀ de Lambda-Cialotrina (0,0134 µL/100 mL), Glifosato (712,29 µL/100 mL), Limoneno (1,44 µL/100 mL), e a concentração de 250 µL/ 100 mL de Azadiractina, através do mesmo procedimento descrito anteriormente. O tratamento controle foi feito apenas com a solução de mel (1:1) + DMSO a 1%. Após 24 h da instalação dos bioensaios de toxicidade, as abelhas foram imobilizadas a uma temperatura de 4 °C e maceradas em 500 µL do tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M), sendo utilizada 10 amostras por tratamento, cada amostra era constituída por 1 abelha operária. O macerado foi retirado com um pipetador automático (abelha operária + tampão) e armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado.

Todo o procedimento foi feito em baixa temperatura para evitar a oxidação das amostras. Para o preparo das amostras, cada grupo de amostras foram centrifugados por 3 minutos a 3000 g. Em seguida, foram separados 100 µL de cada amostra para análise das proteínas solúveis totais e 200 µL para as análises de lipídeos, açúcar total e glicogênio.

Extração e Quantificação das Proteínas Solúveis Totais. As proteínas solúveis totais foram determinadas a partir do método de Bradford (1976). 100 µL de cada amostra de macerado foram transferidos para tubos de vidro de centrifugação, onde foi acrescentado o corante Bradford (0,01% de Comissie Blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol) até alcançar o volume de 5 mL. Posteriormente, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex e em seguida permaneceram em repouso por 2 minutos no escuro. Após, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 595 nm. A unidade de leitura utilizada foi µg/mL.

Extração e Quantificação de Lipídio, Açúcar Total e Glicogênio. O conteúdo de lipídio, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b), em que 200 µL do macerado homogeneizado foi acrescido de 200 µL de sulfato de sódio e 800 µL de clorofórmio e metanol (1:1), e centrifugado a 3000 g por 3 min. O precipitado foi utilizado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante transferido para um microtúbulo onde foi acrescentado 600 µL de água destilada e centrifugado a 3000 g por 3 min. O precipitado foi então utilizado para a análise de lipídeo e o sobrenadante para análise de açúcar total. O lipídio foi tratado com reagente ácido fosfórico/vanilina enquanto que o açúcar total e o glicogênio, tratados com reagente ácido sulfúrico/antrona. Em seguida, a absorvância foi verificada em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 625 nm. A unidade de leitura utilizada foi µg/mL.

Análise Estatística. As Concentrações Letais (CL_{50}) de cada produto e composto estudado, foram determinadas através da análise de probit pelo programa SAS ProcProbit (SAS 2002). Os dados das análises histoquímica e bioquímica assumiram normalidade e homogeneidade e foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (SAS 2002).

Resultados

Bioensaio de Toxicidade por Ingestão. O inseticida Karate[®], o herbicida Glifosato e o composto Limoneno se mostraram tóxicos as abelhas *A. mellifera* quando contaminadas por ingestão. O inseticida Karate[®] apresentou uma CL_{50} de 0,0134 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ e foi a substância mais tóxica testada, seguido pelo composto Limoneno que apresentou CL_{50} de 1,44 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$. O herbicida Glifosato apresentou baixa toxicidade, possuindo uma CL_{50} de 712,29 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$. O inseticida Karate[®] possui a maior RT, sendo 53.156 vezes mais tóxico em comparação ao herbicida Glifosato, e o composto Limoneno foi 494,64 vezes mais tóxico em comparação ao herbicida Glifosato (Tabela 1).

Não foi possível determinar uma CL_{50} para o inseticida botânico Azamax[®], pois foi observado que o mesmo ocasionou repelência a partir de 275 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$. Com isso fez-se necessário utilizar a maior concentração que ocasionou morte sem levar a repelência do inseto. Neste contexto, foi selecionada a concentração de 250 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$. Concentrações inferiores não ocasionaram letalidade e repelência.

Análise Histológica e Histoquímica do Intestino Médio de *Apis mellifera*. As abelhas provenientes do grupo controle apresentaram o intestino médio envolto por fibras musculares finas dispostas em duas camadas: uma interna circular, que origina as pregas do intestino médio, e outra, externa longitudinal. Em seu epitélio foi possível observar dois tipos celulares: as células digestivas ou principais e as células regenerativas. As células digestivas também chamadas de colunares apresentaram núcleo esférico e central, com microvilosidades em sua região apical. As regenerativas

encontraram-se na base do epitélio, com formato piramidal, formando ninhos. Acima das microvilosidades foi observada a matriz peritrófica separando o material presente no lúmen do epitélio. Ainda no lúmen esferocristais estavam presentes (Figs. 1, A1, A2 e A3).

No intestino médio do grupo tratado com o composto Limoneno na CL_{50} (1,44 μ L/ 100 mL), foi observado, assim como no controle, duas camadas musculares, epitélio com células digestivas e regenerativas. Contudo a matriz peritrófica não permaneceu conservada ao longo do epitélio (Figs. 1, B1, B2 e B3).

No grupo tratado com o Azamax[®] na maior concentração que ocasionou mortalidade sem ocasionar repelência (250 μ L/100 mL), não foi possível observar a matriz peritrófica. O epitélio apresentou uma desorganização, como também a presença de núcleos fragmentados e protrusões citoplasmáticas (Figs. 1, C1, C2 e C3).

O intestino médio onde as abelhas foram tratadas com o Glifosato na CL_{50} (712,29 μ L/ 100mL) apresentou uma grande quantidade de protrusões citoplasmáticas, e um comprometimento da matriz peritrófica (Figs. 1, D1, D2 e D3). Por fim, as abelhas submetidas a CL_{50} (0,0134 μ /100 mL) do Karate[®] também apresentaram protrusões citoplasmáticas saindo do epitélio e a presença da matriz peritrófica não foi observada.

Os resultados da análise histoquímica das células epiteliais apresentaram diferença estatística em relação a detecção de carboidratos neutros entre o controle e demais tratamentos, e também entre os tratamentos. O grupo controle exibiu uma maior reação positiva ao corante P.A.S em comparação aos tratamentos, após 24 horas de exposição. O grupo que foi tratado com Limoneno e Glifosato não obtiveram diferença entre si para reação ao corante P.A.S., porém o grupo Glifosato também não diferiu dos inseticidas Karate[®] e Azamax[®], que tiveram os piores resultados na revelação de polissacarídeos neutros nas células (Fig. 2). Quanto à detecção de proteínas totais por Xylidine Ponceau, as análises histoquímicas revelaram que o grupo controle obteve uma maior coloração

positiva e, portanto, uma maior quantidade de proteínas totais, quando comparado aos grupos tratados com Karate[®], Glifosato, Azamax[®] e Limoneno. Não houve diferença na detecção de proteínas totais entre os tratamentos (Fig. 3).

Ensaio Bioquímico. A quantificação de proteínas totais revelou que as concentrações CL₅₀ de Limoneno ($53,138 \pm 4,12 \mu\text{g/mL}$) e Glifosato ($54,000 \pm 14,15 \mu\text{g/mL}$) causaram a maior redução na quantidade de proteína em comparação ao grupo controle ($135,31 \pm 10,42 \mu\text{g/mL}$). Também houve redução na quantidade de proteína em insetos tratados com a concentração CL₅₀ de Karate[®] ($108,277 \pm 11,92 \mu\text{g/mL}$) e na concentração de 250 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ de Azamax[®] ($94,676 \pm 7,18 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 4).

A quantificação de lipídio mostrou que as CL₅₀ de Glifosato ($63,714 \pm 10,43 \mu\text{g/mL}$) e Karate[®] ($55,857 \pm 10,43 \mu\text{g/mL}$) e a concentração de 250 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ de Azamax[®] ($34,785 \pm 9,29 \mu\text{g/mL}$) promoveram uma alta redução na quantidade de lipídio em contraste com o grupo controle ($180,142 \pm 27,26 \mu\text{g/mL}$), e, embora em menor proporção, a CL₅₀ de Limoneno ($105,428 \pm 11,58 \mu\text{g/mL}$) também reduziu a quantidade de lipídio (Fig. 5). Os bioensaios de extração e quantificação de açúcar total revelaram que a concentração CL₅₀ de Glifosato ($162,944 \pm 10,99 \mu\text{g/mL}$) não promoveu a redução de açúcar total quando comparado ao grupo controle ($152,287 \pm 14,24 \mu\text{g/mL}$), o mesmo não ocorreu com as demais concentrações testadas de Karate[®] ($95,881 \pm 13,99 \mu\text{g/mL}$), Limoneno ($116,21 \pm 11,89 \mu\text{g/mL}$) e Azamax[®] ($114,43 \pm 15,50 \mu\text{g/mL}$) que diferiram do controle e reduziram a quantidade de açúcar total (Fig. 6).

A quantificação de glicogênio demonstrou que as concentrações CL₅₀ de Limoneno ($56,581 \pm 5,77 \mu\text{g/mL}$) e Glifosato ($44,662 \pm 5,49 \mu\text{g/mL}$) não causaram a redução de glicogênio quando comparado com o grupo controle ($60,594 \pm 3,98 \mu\text{g/mL}$), entretanto, a CL₅₀ de Glifosato não se diferiu estatisticamente das outras concentrações testadas, CL₅₀ e 250 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ de Karate[®] ($34,187 \pm 3,46 \mu\text{g/mL}$) e Azamax[®] ($35,044 \pm 6,99 \mu\text{g/mL}$), que promoveram a redução na quantidade de

glicogênio (Fig. 7). De modo geral, os tratamentos com os inseticidas Karate® e Azamax® promoveram maiores reduções nos valores nutricionais em µg/mL.

Discussão

Os inseticidas piretróides e o herbicida Glifosato são insumos muito utilizados na agricultura, e o resíduo gerado por estes defensivos químicos podem contaminar as abelhas e os produtos apícolas (Zhang 2018, Sgargi et al. 2020). Charreton et al. (2015), por exemplo, demonstram por meio de estudos comportamentais a perda das funções locomotoras de abelhas jovens (1 dia de idade) submetidas a doses subletais dos piretróides cipermetrina (2,5 ng / abelha), tetrametrina (70 ng / abelha), tau-fluvalinato (33 ng / abelha) e do neonicotinoide tiametoxam (3,8 ng / abelha). Embora o Glifosato não tenha apresentado toxicidade a *A. mellifera*, Luo et al. (2021) identificaram diversas alterações comportamentais negativas nas mesmas após contato crônico (11 dias) a doses subletais da formulação comercial de Glifosato, e obtiveram uma DL₅₀, via ingestão, de 309 µg / abelha.

O Limoneno estudado nesta pesquisa é classificado como um terpeno, sabe-se que este composto possui ação tóxica por contato, fumigação e ingestão para insetos pragas (Ibrahim et al. 2001), o que pode explicar a sua ação tóxica sobre as abelhas; além disso, estudos demonstram que as substâncias dessa classe química poder agir contra os insetos através da inibição da ATP sintase, alquilação de nucleófilo, afetando também no processo de muda, ou ainda podem interferir no sistema nervoso dos insetos pela inibição da acetilcolinesterase (Langenhein 1994, Yeom et al. 2012, López & Pascual-Villalobos 2014).

O não estabelecimento da curva de mortalidade do Azamax® se deu ao fato de apresentar uma ação repelente. Esses resultados corroboram com Cherry & Nuessly (2010), Ikeura et al. (2013) e Andrade et al. (2013) que relataram a repelência ocasionada pelo azadiractina, composto base do

Azamax[®], em *Melanotus communis* (Gyllenhal), *Mamestra brassicae* (Linnaeus) e *Aphis gossypii* (Glover).

Contudo, apesar da repelência, os indivíduos que entraram em contato com este inseticida botânico, apresentaram alterações celulares, sendo observado a presença de núcleos fragmentados e protrusões citoplasmáticas. Isso porque o Azamax[®] pode interferir em parâmetros importantes, como a ruptura da membrana plasmática, vacuolização do citoplasma, formação e ampliação de espaços intercelulares, entre outros, possivelmente devido ao processo necrótico da célula (Correia et al. 2009, Almehmadi 2011, Scudeler & Santos 2013, Scudeler et al. 2014). Logo, a análise sobre a possível influência do Azamax[®], bem como do herbicida Glifosato, sobre o CCD se torna mais complexa e pesquisas mais amplas são necessárias. Entretanto, verificou-se na presente pesquisa que o inseticida piretróide Karate[®] e o composto Limoneno se destacaram como as substâncias mais tóxicas, e as abelhas *A. mellifera* podem ser expostas a esses defensivos agrícolas durante o forrageamento, contribuindo assim, entre outros fatores, para o CCD.

Quanto às análises histológicas, o intestino médio do grupo controle de abelhas *A. mellifera*, corroborou com o padrão morfológico descrito por Cruz-Landim (2009), mas aquelas tratadas com o inseticida botânico, e com os herbicida e inseticida sintéticos apresentaram uma desorganização do epitélio, com a presença de protrusões, e no caso do Azamax[®] também se tem a presença de núcleos fragmentados. Logo, essas patologias encontradas no epitélio intestinal das abelhas, são indícios de que seu órgão está com o funcionamento comprometido.

Além disso, todos os xenobióticos (naturais e sintéticos) levaram ao comprometimento da matriz peritrófica, isso também pode sugerir danos nas células digestivas, pois são elas que secretam essa matriz (Hegedus et al. 2009). A matriz peritrófica é um componente importante na fisiologia digestiva dos insetos, visto que tem a função de proteger o epitélio do intestino médio contra abrasão

por partículas e alimentos ásperos, patógenos e toxinas e sua ausência expõem as células a danos diretos (Toprak et al. 2016).

A ausência da matriz peritrófica também ocasiona a redução da aquisição dos nutrientes, uma vez que age compartimentalizando o bolo alimentar, e por consequência, potencializando a ação enzimática, ao mesmo tempo em que protege o epitélio contra a ação dessas enzimas (Klowden 2007, Chapman 2013). Desta forma, não é surpresa que todos os produtos e composto ocasionaram redução na quantificação de carboidratos e proteínas no intestino de *A. mellifera*, indicando uma dificuldade na absorção dos nutrientes.

O déficit nutricional desenvolvido devido aos danos celulares provavelmente acarretou na realocação de nutrientes entre os processos fisiológicos, devido a possíveis trade-offs importantes para sobrevivência do organismo (Blacher et al. 2017). A realocação de recursos pode ser observada de forma mais evidente no tratamento com Glifosato, onde ocorreu a redução do glicogênio e lipídio, porém não houve a redução do açúcar total. Isso significa que não houve o interrompimento do fornecimento de energia para o organismo sob estresse, porque o glicogênio foi utilizado, ao entrar na via glicolítica, para liberação de glicose na hemolinfa (Chapman 2013).

Mas de forma geral, todas as substâncias avaliadas reduziram os níveis de proteína, lipídio, glicogênio e açúcar total em abelhas, ou seja, podem interferir negativamente no desenvolvimento e reprodução desses indivíduos (Blacher et al. 2017), uma vez que as proteínas são essenciais em funções estruturais, enzimáticas e hormonais (síntese); os lipídios são fontes de reserva energética, e expressam funcionalidades estruturais e metabólicas; os carboidratos são fontes energéticas importantes. Já o glicogênio é um carboidrato que fica alojado no corpo gorduroso, mas também estão presente nos músculos, intestino e outros tecidos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003, Klowden 2007).

O grupo de abelhas tratadas com o herbicida Glifosato e com o composto natural Limoneno obtiveram uma redução de proteína mais evidente em comparação aos inseticidas Karate[®] e Azamax[®]. Cruz et al. (2017) também mostraram que o limoneno e E-anetol, utilizados em associação ou não, foram capazes de reduzir os níveis de proteína, lipídio, glicogênio e açúcar total em lagartas *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith).

Outros trabalhos também demonstraram que modificações morfológicas no intestino médio dos insetos levam a redução dos níveis das macromoléculas essenciais para as funções bioquímicas. Cunha et al. (2015), por exemplo, observaram que uma população de bicudo tratada com pimetozina teve alterações ultraestruturais e morfológicas no intestino médio, de modo que levou a redução nos níveis de glicogênio e lipídeos. Sharma et al. (2011) também mostraram o estresse no sistema fisiológico causado por extratos de *Artemisia annua* (Asteraceae) e *Azadirachta indica* (Meliaceae) ao alterar os teores de carboidratos, lipídeos e proteínas de larvas de *Anopheles stephensi* (Liston) e *Culex quinquefasciatus* (Say).

Por fim, é possível concluir que os produtos sintéticos bem como os naturais aqui estudados são prejudiciais às abelhas *A. mellifera* e podem contribuir para o CCD, pois causaram alterações histopatológicas nas células do intestino médio, e consequentemente, ocasionaram redução nutricional nas abelhas. Por ser repelente a *A. mellifera* em altas dosagens, é mais difícil o contato dessas abelhas com o inseticida botânico Azamax[®] no campo, assim, o uso deste produto pode ser uma opção viável, mas de forma cautelosa para evitar o contato das abelhas com o mesmo. Vale ressaltar que os inseticidas naturais precisam ser estudados caso a caso, ou seja, cada produto de forma individual, para garantir se há seletividade aos insetos benéficos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado a primeira autora.

Literatura Citada

- Almeida, G.D., J.C. Zanuncio, S. Senthil-Nathan, D. Pratissoli, R.A. Polanczyk, D.O. Azevedo & J.E. Serrão. 2014.** Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebr. Surviv. J.* 11: 79-86.
- Almehmadi, R.M. 2011.** Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). *J. Entomol.* 8:63-72.
- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2013.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotech. Histochem.* 88: 1-11.
- Andrade, L.H., J.V. Oliveira, I.M.M. Lima, M.F. Santana & M.O. Breda. 2013.** Repellent effect of azadirachtin and essential oils on *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in cotton plants. *Cienc. Agron.* 44: 628-634. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000300027>
- Blacher, P., T.J. Huggins & A.F.G. Bourke. 2017.** Evolution of ageing, costs of reproduction and the fecundity-longevity trade-off in eusocial insects. *Proc. Royal Soc. B.* 284: 20170380. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0380>
- Barbosa, A.L., F.M. Pereira, J.M.V. Neto, J.G.S. Rego, M.T.R. Lopes & R.C.R. Camargo. 2007.** Criação de abelhas (apicultura). Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 113p.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brito, D.R.B., D.M. Pinto-Zevallos, J.G. Sena Filho, C.R. Coelho, P.C.L. Nogueira, H.W.L. Carvalho & A.V. Teodoro. 2021.** Bioactivity of the essential oil from sweet orange leaves against the coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae) and selectivity to a generalist predator. *Crop Prot.* 148: 105737. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105737>
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Charreton, M., A. Decourtye, M. Henry, G. Rodet, J.C. Sandoz, P. Charnet P & C. Collet. 2015.** A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid

inseticidas in the honeybee *Apis mellifera*. PLoS ONE, 10: e0144879. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144879>

Cherry, R & G. Nuessly. 2010. Repellency of the biopesticide, azadirachtin, to wireworms (Coleoptera: Elateridae). Fla. Entomol. 93: 52-55.

Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.

Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, F.S.C. Lopes, D.R.S. Barbosa, M.O. Breda, K.A. Dutra, C.A. Guedes, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016. Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 109: 660-666.

Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017. Effect of transanethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem.-Biol. Interact. 263: 74-80.

Cruz-Landim, C. 2009. Abelhas morfologia e função de sistemas. São Paulo, UNESP, 1286 p.

Cunha, F.M., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Pereira, B.F., Caetano, F.H., Torres, J.B., Gonçalves, G.G.A. & Santos, F.A.B. 2015. Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Anim. Biol. 65: 271–285. DOI: doi.org/10.1163/15707563-00002476.

Dormann, C.F., O. Schweiger, P. Arens, I. Augenstein, St. Aviron, D. Bailey, J. Baudry, R. Billeter, R. Bugter, R. Bukáček, F. Burel, M. Cerny, R. De Cock, G. De Blust, R. DeFilippi, T. Diekötter, J. Dirksen, W. Durka, P.J. Edwards, M. Frenzel, R. Hamersky, F. Hendrickx, F. Herzog, St Klotz, B Koolstra, A Lausch, D Le Coeur, J Liira, J P Maelfait, P Opdam, M Roubalova, A. Schermann-Legionnet, N. Schermann, T. Schmidt, M.J.M. Smulders, M. Speelmans, P. Simova, J. Verboom, W. van Wingerden & M. Zobel. 2008. Prediction uncertainty of environmental change effects on temperate European biodiversity. Ecol. Lett. 11: 235–244.

Ferreira, T.P., E.E. Oliveira, P.H. Tschoeke, R.G. Pinheiro, A.M.S. Maia & R.W.S. Aguiard. 2017. Potential use of Negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. Ind. Crops Prod. 109: 151-157.

Frizzas, M. R., C.M Oliveira & C. Omoto. 2017. Diversity of insects under the effect of Bt maize and insecticides. Arq. Inst. Biol. 84: 1-8, e0062015.

- Gashout, H.A. & E. Guzmán-Novoa. 2009.** Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Apic. Res. 48: 263–269. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.4.06>
- Hendrickx, F., J.-P. Maelfait, W.V. Wingerden, O. Schweiger, M. Speelmans, S. Aviron, I. Augenstein, R. Billeter, D. Bailey, R. Bukacek, F. Burel, T. Diekötter, J. Dirksen, F. Herzog J. Liira, M. Roubalova, V. Vandomme & R. Bugter. 2007.** How landscape structure, land-use intensity and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. J. Appl. Ecol. 44: 340–351.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott & U. Toprak. 2009.** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Ann. Rev. Entomol. 54: 285-302.
- Ibrahim, M.A., K. Pirjo, A. Aflatuni & J.K. Holopainen. 2001.** Insectidal, repellen, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pest. Agric. Food Sci. 10: 243-259.
- Ikeura, H., A. Sakura & M. Tamak. 2013.** Repellent effect of neem against the cabbage armyworm on leafvegetables. J. Agric. Sustain. 4: 1-15.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents inmodern agriculture and an increasingly regulatedworld. Ann. Rev. Entomol. 51:45–66.
- Isman, M.B. 2020.** Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise? Ann. Rev. Entomol. 65: 233–249.
- Junqueira, L.C.U. & Junqueira, L.M.M.S. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Santos Editora, 270p
- Klowden, M.J. 2007.** Physiological systems in insects. New York, Academic Press, 668p.
- Langenheim, J.H. 1994.** Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. J. Chem. Ecol. 20: 1223–1280.
- Leclercq, G., N. Gengler & F. Francis. 2018.** How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. Entomol. Faun. - faunistic entomology. 71: 1-13.
- López, M.D. & M.J. Pascual-Villalobos. 2014.** Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? Flavour Fragr. J. 30, 108–112.
- Luo, Qi-H., J. Gao, Y. Guo, C. Liu, Yu-Z. Ma, Zhi-Y. Zhou, P.-Li Dai, C.-S. Hou1, Y.-Y. Wu & Q.-Y. Diao. 2021.** Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. Sci. Rep. 11: 2115. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80445-4>
- Madbouly, S.A., C. Zhang & M.R. Kessler. 2015.** Bio-based plant oil polymers and composites. Oxford, Elsevier Inc., 213p.

- Neumann, P. & N.L. Carreck. 2010.** Honey bee colony loss. *J. Apic. Res.* 49: 1-6.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociência* 11: 195-205.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Hystochemistry: theoretical and applied. London, Churchill, 998p
- Potts, S.G., J.C. Biesmeijer, C. Kremen, P.N.O. Schweiger & W.E. Kunin. 2010.** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25: 345-353.
- SAS Institute. 2002.** User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute INC., Cary, NC.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. *AJ. Am. J. Roentgenol* 192: 330–334.
- Scudeler, E.L., C.R. Padovani. & D.C. Santos. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. *Acta Histochemica*, 116:771-780.
- Scudeler, E.L. & D.C. Santos. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron* 44: 125-132.
- Sgargi, D., B. Adam, L.T. Budnik, G. Dinelli, H.R. Moldovan, M.J. Perry, P.T.J. Scheepers, V. Schlunssen, J.P. Teixeira, D. Mandrioli & F. Belpoggi. 2020.** Protocol for a systematic review and meta-analysis of human exposure to pesticide residues in honey and other bees' products. *Environ. Res.* 186, 109470. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109470>
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status os carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
- Showler, A.T., J.L. Harlien & A.A.P. Léon. 2019.** Effects of laboratory grade limonene and a commercial limonene-based insecticide on *Haematobia irritans irritans* (Muscidae: Diptera): deterrence, mortality, and reproduction. *J. Med. Entomol.* 56: 1064-1070.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2017.** Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) midgut and fat body. *Biotech. Histochem.* 5: 1-13.
- Stankus, T. 2014.** Reviews of science for science librarians: an update on honeybee colony collapse disorder. *Sci. Technol. Libr.* 33: 228-260.
- Tan, K., W. Chen, S. Dong, X. Liu, Y. Wang & J.C. Nieh. 2015.** A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Sci. Rep.* 5:10989. DOI: 10.1038/srep10989

- Toprak, U., M. Erlandson, D. Baldwin, S. Karcz, L.Wan & D.D. Hegedus. 2016.** Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. *J. Insect Sci.* 23: 656-674.
- Umpiérrez, M.L., J. Paullierb, M. Porrinic, M. Garridoc, E. Santosd & C. Rossinia. 2017.** Potential botanical pesticides from Asteraceae essential oils for tomato production: activity against whiteflies, plants and bees. *Ind. Crops Prod.* 109: 686–692.
- Van Handel, E.1985a.** Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 299–301.
- Van Handel, E. 1985b.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302–304.
- Yeom, H.J., J.S. Kang, G.H. Kim & I.K. Park. 2012.** Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). *J. Agric. Food Chem.* 60: 7194–7203.
- Zhang, W.J. 2018.** Global pesticide use: profile, trend, cost / benefit and more. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 8: 1-27.

Tabela 1. Toxicidade do composto Limoneno, do herbicida Glifosato e do Inseticida Karate em abelhas operárias *Apis mellifera* contaminadas por ingestão.

Tratamentos	N ¹	GL ²	Inclinação ³ (±EP)	CL ₅₀ ⁴ (IC95%)	RT ₅₀ ⁵	χ ²
Limoneno	150	3	2,1±0,59	1,44 (0,92-2,05)	494,64	4,28
Glifosato	150	3	6,7±1,53	712,29 (631,00-817,49)	-	5,57
Karate	150	3	1,2±0,23	0,0134 (0,005-0,023)	53.156	0,73

¹Número de insetos usados no teste,

²Grau de liberdade,

³Erro padrão da média,

⁴ Concentração Letal (µL/100 mL) e intervalo de confiança,

⁵ Razão de toxicidade,

χ²= Qui-quadrado.

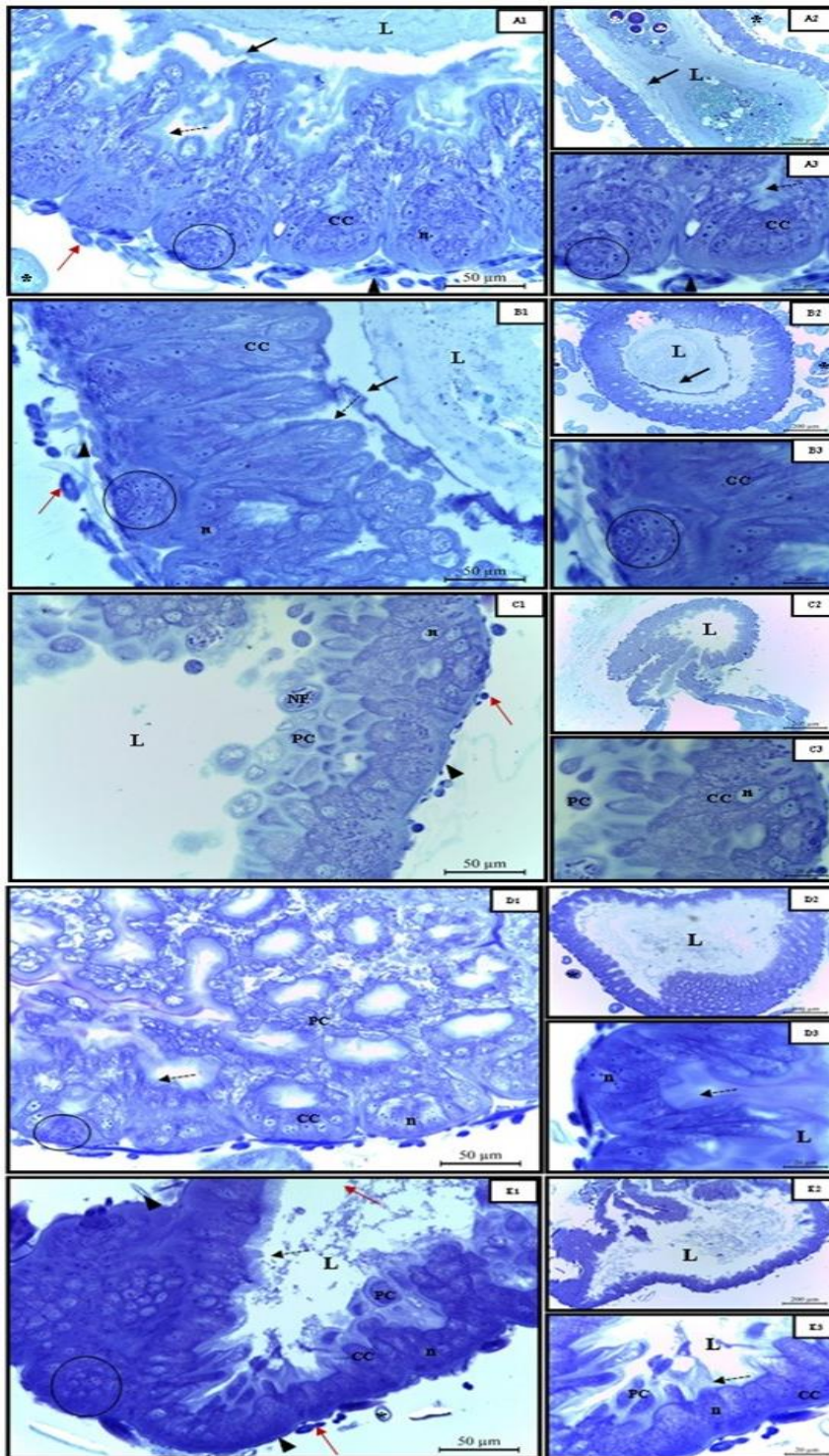


Figura 1. Histologia do intestino médio de *Apis mellifera*. A: controle, B: Limoneno, C: Azamax, D: Glifosato, E: Karate. Coloração azul de toluidina. Seta preta: Matriz peritrófica. L: Lúmen. NF: núcleo fragmentado. Círculo preto: ninho de células regenerativas. CC: células colunares. PC: Protrusões citoplasmáticas. Asterisco preto: Túbulos de Malpighi. Asterisco branco: esferocristais. Seta vermelha: musculo longitudinal. Triangulo preto: musculo transversal. Seta tracejada: Microvilosidades.

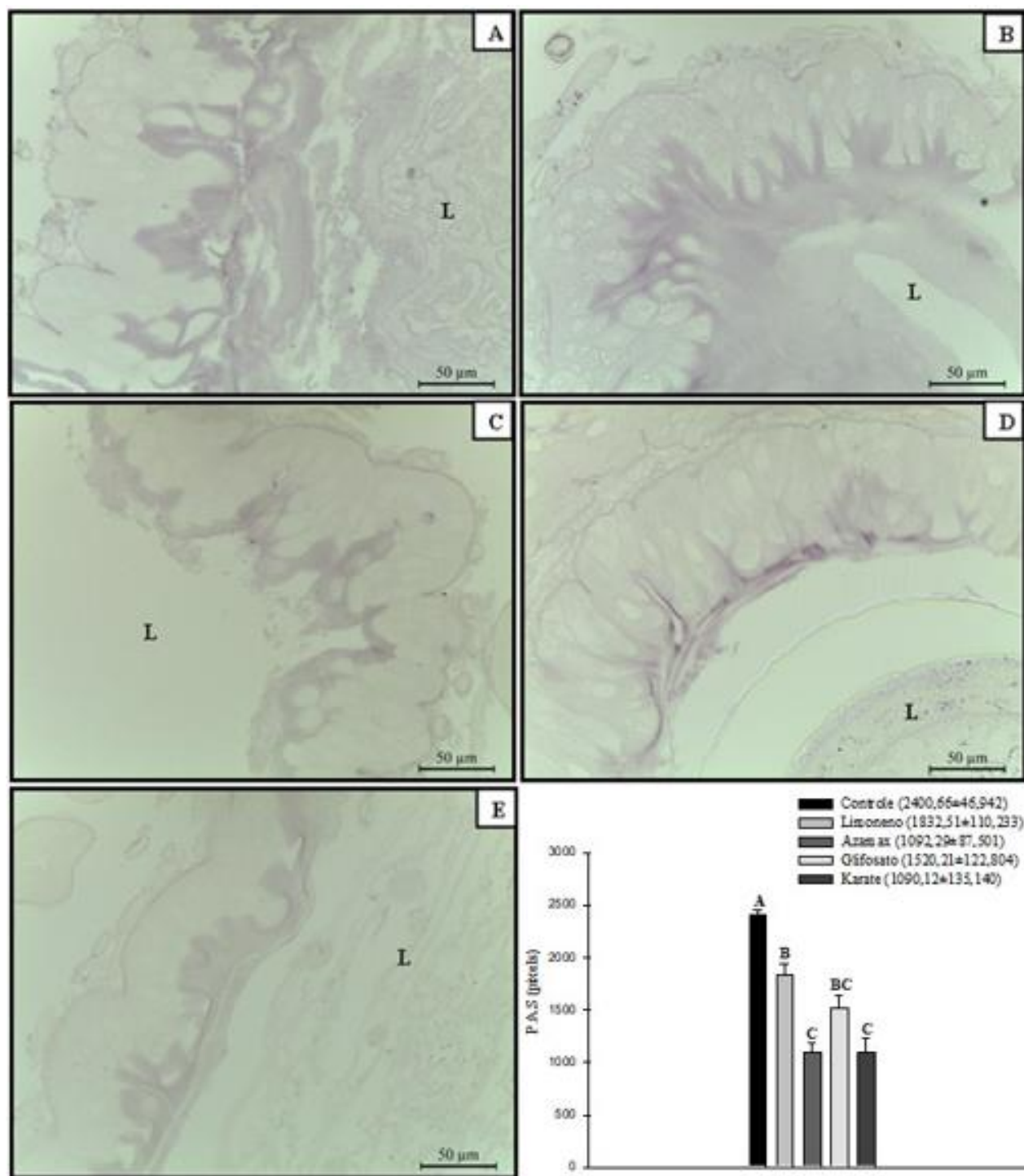


Figura 2. Histoquímica do intestino médio de *Apis mellifera* para carboidratos neutros. A: controle, B: Limoneno, C: Azamax, D: Glifosato, E: Karate. Ácido Periódico Schiff (P.A.S.). Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

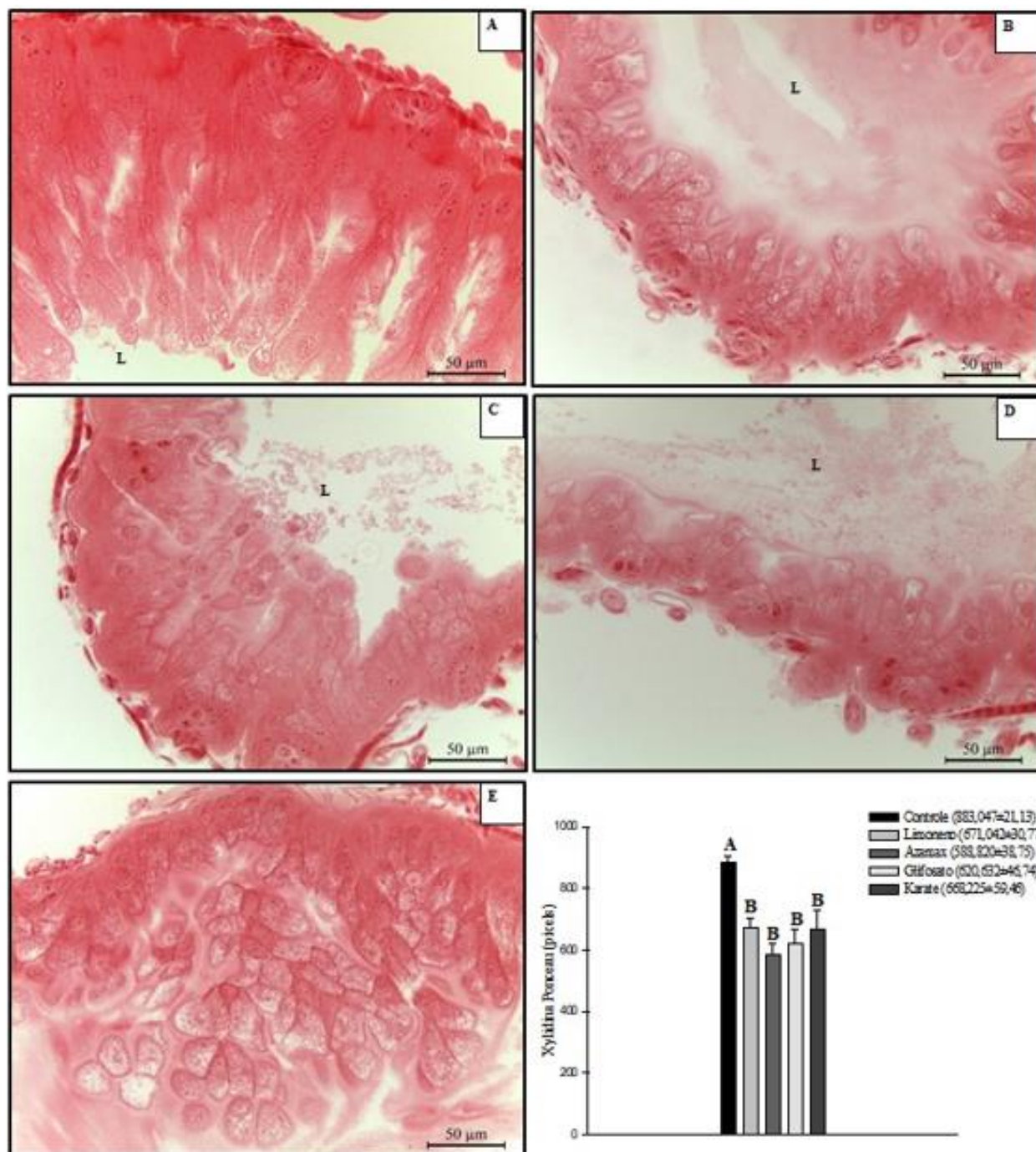


Figura 3. Histoquímica do intestino médio de *Apis mellifera* para proteínas totais. A: controle, B: Limoneno, C: Azamax, D: Glifosato, E: Karate. Coloração Xylidine Ponceau. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

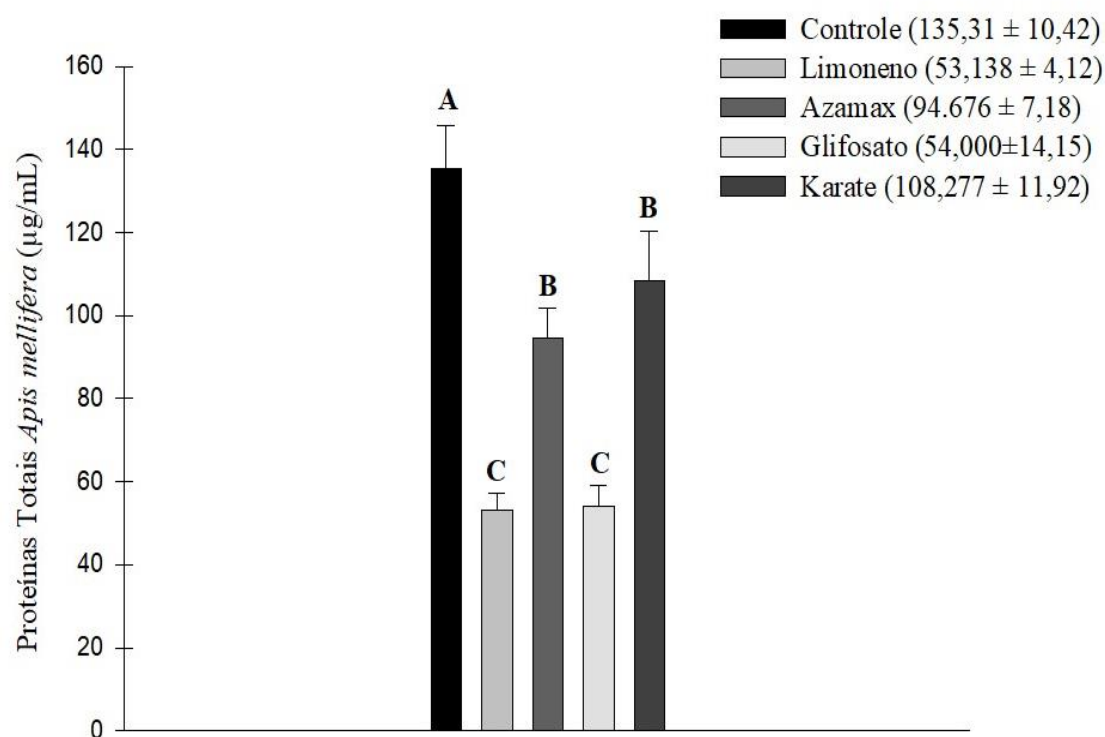


Figura 4. Quantidade de proteínas totais (médias $\pm$ erro padrão) em adultos de *Apis mellifera* com 24h após bioensaio de toxicidade por ingestão na concentração Letal (CL₅₀) do composto Limoneno, do herbicida Glifosato e do inseticida Karate. Para o inseticida Azamax foi utilizada a maior concentração que não apresentou repelência. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

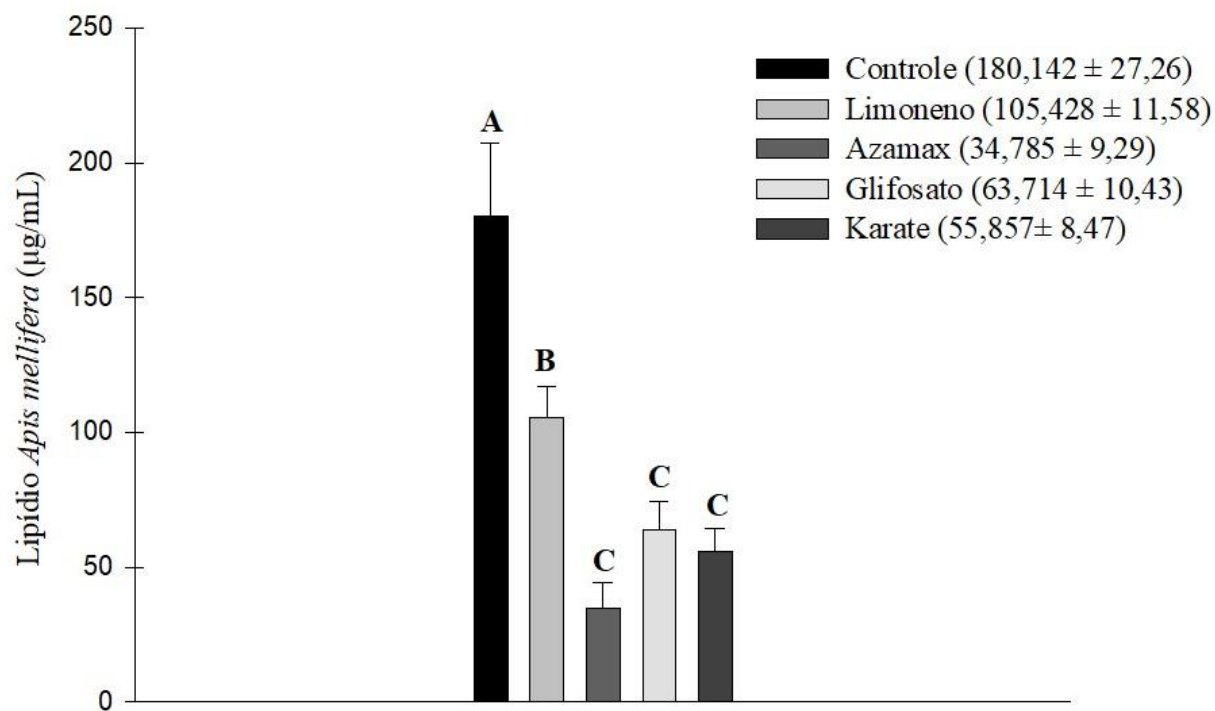


Figura 5. Quantidade de lipídios (médias $\pm$ erro padrão) em adultos de *Apis mellifera* com 24h após bioensaio de toxicidade por ingestão na concentração Letal (CL_{50}) do composto Limoneno, do herbicida Glifosato e do inseticida Karate. Para o inseticida Azamax foi utilizada a maior concentração que não apresentou repelência. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

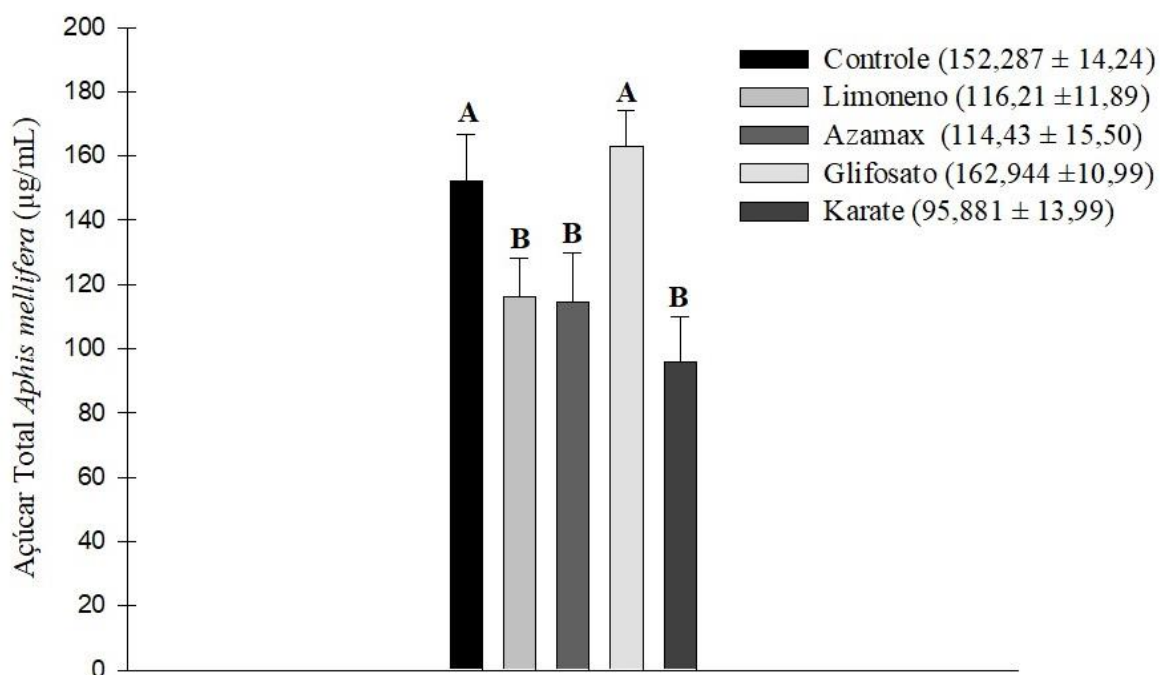


Figura 6. Quantidade de açúcar total (médias $\pm$ erro padrão) em adultos de *Apis mellifera* com 24h após bioensaio de toxicidade por ingestão na concentração Letal (CL₅₀) do composto Limoneno, do herbicida Glifosato e do inseticida Karate. Para o inseticida Azamax foi utilizada a maior concentração que não apresentou repelência. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

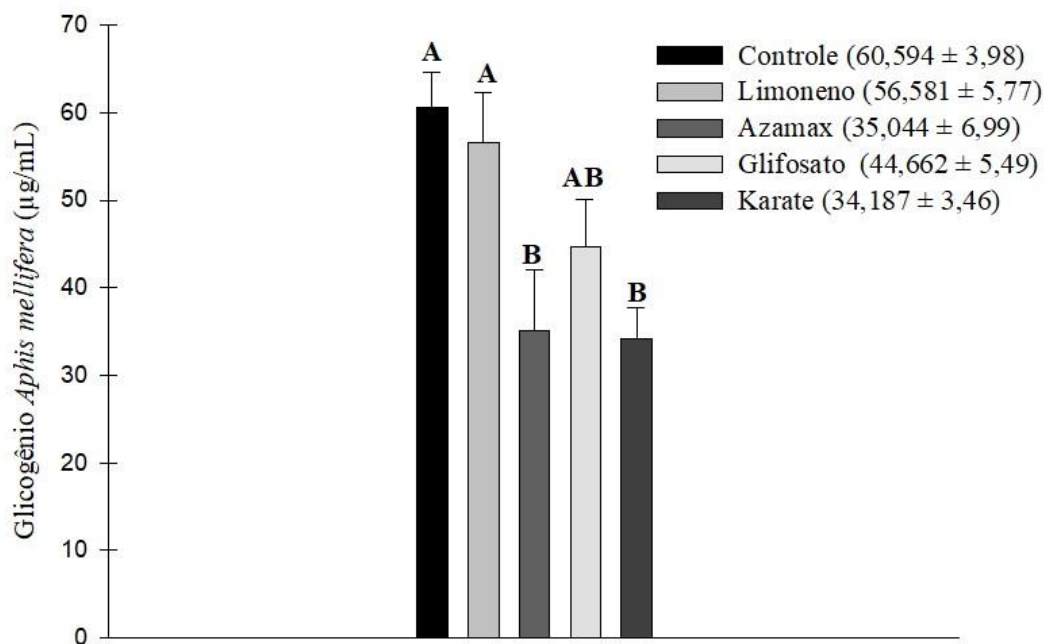


Figura 7. Quantidade de glicogênio (médias $\pm$ erro padrão) em adultos de *Apis mellifera* com 24h após bioensaio de toxicidade por ingestão na concentração Letal (CL_{50}) do composto Limoneno, do herbicida Glifosato e do inseticida Karate. Para o inseticida Azamax foi utilizada a maior concentração que não apresentou repelência. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Os resultados desta dissertação ampliam o conhecimento acerca do declínio de abelhas observado nos últimos tempos ao agregar mais informações sobre as substâncias, sintéticas e naturais, utilizadas como defensivos na indústria agrícola, que podem afetar negativamente a sobrevivência destas espécies de polinizadores ao interferir na sua fisiologia.

Em geral, os produtos naturais são considerados seguros aos insetos benéficos, entretanto, nesta pesquisa fica evidente a necessidade de se analisar cada caso isoladamente, pois tanto o inseticida botânico derivado da azadiractina (Azamax®) e o composto Limoneno tiveram resultados semelhantes aos produtos sintéticos, inseticida lambda-cialotrina (Karate®) e herbicida glifosato (Roundup®), causando alterações histopatológicas nas células do intestino médio das abelhas.

Em todos os tratamentos foi possível observar o comprometimento ou a completa ausência da matriz peritrófica. As substâncias que mais causaram danos visíveis as células epiteliais foram os inseticidas Karate® e Azamax® e o herbicida Glifosto, pois as amostras contaminadas com estes produtos apresentaram uma desorganização do epitélio e um grande número de protrusões citoplasmáticas, com a presença ainda de núcleos fragmentados no intestino de abelhas tratadas com Azamax®.

O comprometimento das células digestivas de *A. mellifera* contaminadas com as CL_{S50} e com a concentração determinada para o Azamax® (250µL/100 mL), também ocasionou uma redução na capacidade de absorção de nutrientes essenciais para os animais, o que provavelmente implicará no desenvolvimento e terá reflexo na reprodução desses insetos. Uma vez que foi observado que os inseticidas Azamax® e Karate® ocasionaram a redução de todos os nutrientes analisados (proteína,

lipídio, açúcar total e glicogênio), porém o grupo exposto ao Limoneno e ao Glifosato apresentaram uma grande diminuição de proteínas, apesar do primeiro não ter afetado a quantidade de glicogênio e o segundo a quantidade de açúcar total nas abelhas submetidas a estes tratamentos.

Assim, as abelhas expostas ao Azamax[®], ao composto Limoneno, ao inseticida Karate[®] e ao herbicida Glifosato sofrem alterações fisiológicas prejudiciais no seu sistema digestório.

Por ser repelente a *A. mellifera* em altas dosagens, é mais difícil o contato dessas abelhas com o inseticida botânico Azamax[®] no campo, assim, o uso deste produto pode ser uma opção viável, mas de forma cautelosa para evitar o contato das abelhas com o mesmo.