

IMUNOLOGIA DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

por

FERNANDO HENRIQUE BOAVENTURA DE MELO

Sob orientação do Professor Claudio Augusto Gomes da Camara - UFRPE

RESUMO

Diante da grande importância das abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) como agentes ecológicos, altamente associadas à humanidade, se torna fundamental a identificação das causas de seu declínio. Assim, este trabalho objetivou avaliar o sistema imunológico desses polinizadores de forma comparativa entre pesticidas sintéticos e naturais, visto que o uso desses defensivos químicos é apontado como um dos multifatores causadores da redução populacional das abelhas. Para tal, operárias foram contaminadas via ingestão, por 24h, com as CL₅₀s do inseticida Karate[®], do composto Limoneno, e herbicida Roundup[®]. Como não foi possível obter a CL₅₀ para o Azamax[®], foi utilizada a concentração de 250 µL/100 mL deste produto, visto que doses acima foram repelentes as abelhas. Em seguida, as operárias foram usadas para análises de apoptose, proliferação celular, estresse oxidativo, atividade da enzima fenoloxidase e níveis de óxido nítrico. Como resultado, foi verificado que todos os produtos estudados causaram a necrose das células do intestino médio, sem indícios de regeneração por meio da proliferação celular. Além disso, com exceção do Limoneno, todos os xenobióticos promoveram estresse oxidativo, que pode explicar o processo necrótico observado. Os dados desta pesquisa sugerem que o sistema imune das abelhas é prejudicado, indicado por um aumento nos níveis NO₂, que pode ser citotóxico, quando sua produção está em desequilíbrio. Houve também um aumento da atividade

da fenoloxidase em todas as amostras, esta enzima também está envolvida nos mecanismos de reconhecimento de agentes estranhos e na produção de melanina. De forma conjunta, os dados mostram o alto risco que essas abelhas correm com a possibilidade de entrar em contato com esses defensivos agrícolas durante seu ciclo de vida, seja ele sintético ou natural. Assim, fica evidente que há necessidade de se testar produtos de forma isolada.

PALAVRAS-CHAVE: Declínio de Polinizadores, Defensivos Agrícolas, Imunologia, Apoptose, Proliferação Celular, Estresse Oxidativo, Óxido Nítrico, Fenoloxidase

IMMUNOLOGY OF BEES *Apis mellifera* EXPOSED TO NATURAL AND SYNTHETIC
XENOBIOTICS

por

FERNANDO HENRIQUE BOAVENTURA DE MELO

Sob orientação do Professor Claudio Augusto Gomes da Camara - UFRPE

ABSTRACT

Given the great importance of *Apis mellifera* bees as ecological agents, highly associated with humanity, it is essential to identify the causes of their decline. Thus, this work aimed to evaluate the immune system of these pollinators in a comparative way between synthetic and natural pesticides, since the use of these chemical pesticides is pointed out as one of the multifactors that cause the reduction of the bee population. For this, the workers were contaminated by ingestion, for 24 hours, with the CL₅₀ of the Karate[®] insecticide, the Limonene compound and the Roundup[®] herbicide. As it was not possible to obtain the LC₅₀ for Azamax[®], a concentration of 250 µL/100 mL of this product was used, since higher doses were repellent to bees. Then, the workers were used for analysis of apoptosis, cell proliferation, oxidative stress, phenoloxidase enzyme activity and nitric oxide levels. As a result, it was found that all products studied caused midgut cell necrosis, with no evidence of regeneration by cell proliferation. Furthermore, with the exception of Limonene, all xenobiotics underwent oxidative stress, which may explain the observed necrotic process. The data from this research suggests that the immune system of bees is impaired, indicated by an increase in NO₂ levels, which can be cytotoxic when its production is in imbalance. There was also an increase in phenoloxidase activity in all samples, this enzyme is also involved in the mechanisms of recognition of foreign agents and in the

production of melanin. Together, the data show the high risk that these bees run with the possibility of coming into contact with these pesticides during their life cycle, whether synthetic or natural. Thus, the need to test products in isolation is evident.

KEY WORDS: Decline of Pollinators, Agricultural Pesticides, Immunology, Apoptosis,
Cell Proliferation, Oxidative Stress, Nitric Oxide, Phenoloxidase

IMUNOLOGIA DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

por

FERNANDO HENRIQUE BOAVENTURA DE MELO

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 – 2023

IMUNOLOGIA DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

por

FERNANDO HENRIQUE BOAVENTURA DE MELO

Comitê de Orientação:

Claudio Augusto Gomes da Camara – UFRPE

Valeria Wanderley Teixeira – UFRPE

Vaneska Barbosa Monteiro - UFRPE

IMUNOLOGIA DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

por

FERNANDO HENRIQUE BOAVENTURA DE MELO

Banca Examinadora:

Glaucilane dos Santos Cruz - UFRPE

Marcílio Martins de Moraes - UFRPE

Claudio Augusto Gomes da Camara – UFRPE

Fernando H. Boaventura de Melo
Mestre em Entomologia

Claudio A. G. da Camara – 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)

- M528i Melo, Fernando Henrique
 Imunologia de abelhas *Apis mellifera* expostas a xenobióticos naturais e sintéticos / Fernando Henrique Melo. -
2023.
 55 f. : il.
- Orientador: Claudio Augusto Gomes da .
 Coorientador: Valeria Wanderley .
 Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia
Agrícola, Recife, 2023.
1. Declínio de Polinizadores. 2. Defensivos Agrícolas. 3. Imunologia. 4. Apoptose. 5. Proliferação Celular. I. , Claudio
Augusto Gomes da, orient. II. , Valeria Wanderley, coorient. III. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

A Catiane Oliveira Souza, Baiana arretada, inteligente e empoderada, minha amada, companheira de todas as horas, fonte inspiradora da minha carreira e vida.

Mas quando você me amar, me abrace e me beije bem devagar

Que é para eu ter tempo, tempo de me apaixonar

Tempo para ouvir o rádio no carro

Tempo para a turma do outro bairro ver e saber que eu te amo

*“Antônio Carlos **Belchior**”*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meus Orixás e minha família.

À minha companheira, Catiane Oliveira Souza.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e ao Restaurante Universitário - RU.

À Fundação de Amparo Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo reajuste e concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Dr. Claudio Augusto Gomes da Camara pela experiência.

À minha co-orientadora, Dra. Valéria Wanderley Teixeira pela sabedoria e compreensão.

A todos pesquisadores e cientistas que tive a satisfação de conhecer nos laboratórios das universidades UFRPE e UFPE, em especial a Dra. Glaucilane dos Santos Cruz, Dra. Vaneska Barbosa Monteiro, Dr. Marcilio Martins de Moraes e Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Pela ajuda nas análises desse trabalho e correção).

À Recife-Pernambuco, pelo amadurecimento e know-how.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	x
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	6
2 IMPACTOS DE XENOBIÓTICOS SOBRE AS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DE ABELHAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DOS INSETOS	16
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE ABELHAS FRENTE À XENOBIÓTICOS ...	19
CONCLUSÃO	22
LITERATURA CITADA.....	22
3 IMUNOTOXICIDADE COMPARADA DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> (HYMENOPTERA: APIDAE) EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E SINTÉTICOS	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30

MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	38
LITERATURA CITADA.....	41
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

É estimado um aumento de cerca de 70% da produção mundial de alimentos até 2050, em concomitância ao crescimento da população humana, e a polinização animal é um serviço ecossistêmico essencial para manutenção da segurança alimentar global, visto que um terço da produção de alimentos é dependente desses organismos (Godfray *et al.* 2010, Tester & Langridge 2010, Ipbes 2016). Em ambientes silvestres e na agricultura, os insetos se destacam como polinizadores, sobretudo as abelhas, as quais são responsáveis pela fecundação de mais de 90% das principais plantas cultivadas no mundo, 30% ainda são visitadas por moscas e menos de 6% recebem a visita de outros táxons (Vanbergen 2013).

Atualmente são descritas mais de 20.000 espécies de abelhas, sendo 2.500 presentes em território brasileiro (Silva 2014, Ipbes 2016, Orr *et al.* 2021). As pertencentes ao gênero *Apis* (Hymenoptera: Apidae) são as mais conhecidas e distribuídas em todos os continentes. A espécie *Apis mellifera* (Linnaeus) tem sua origem na África e Europa, e foi trazida para as Américas no período de colonização (Moritz 2005). Esta abelha é manejada para extração de diversos produtos apícolas e, mais recentemente no Brasil, vem sendo utilizada para polinização de culturas em sistemas de agricultura intensiva (Feitosa *et al.* 2020). A apicultura é reconhecida como uma atividade agropecuária que permite o estabelecimento do tripé da sustentabilidade: econômico, social e ecológico, isto porque gera renda, principalmente para mão de obra familiar, e ainda auxilia para preservação da vegetação nativa (Olinto *et al.* 2015).

Apesar da relevância econômica e ambiental desses animais, a redução populacional de abelhas manejadas é registrada desde a metade do século 20 (Williams *et al.* 2010). Vale salientar

que o declínio desses polinizadores ocorreu em uma velocidade acelerada, após o fenômeno intitulado distúrbio do colapso das colônias (Colony Collapse Disorder- CCD), tendo sua origem durante o inverno de 2006 e 2007 nos Estados Unidos. O CCD tem como sintoma principal o desaparecimento de abelhas adultas, que realizam toda a manutenção da colmeia. Foi observado inicialmente na América do Norte e Europa, em *A. mellifera*, após se expandiu para outros continentes e outras espécies de abelhas (VanEngelsdorp *et al.* 2007, Rader *et al.* 2014).

Estudos de modelagem apontam que o declínio desses polinizadores é devido à agregação de múltiplos fatores, alguns deles são a fragmentação de habitats, queimadas, competição com espécies exóticas, escassez de recursos florais, patógenos e o uso indiscriminado de pesticidas (Carvalho & Del lama 2015, Giannini *et al.* 2015). Este último pode afetar direta ou indiretamente as abelhas, pois elas são contaminadas por doses letais e subletais de inseticidas e herbicidas, encontrados em campos agrícolas durante o forrageamento (Pereira *et al.* 2019, Ferreira *et al.* 2021) ou por contaminação residual na água (Samson-Robert *et al.* 2014). De forma indireta, os pesticidas químicos utilizados para o controle de plantas espontâneas, também impactam a quantidade de alimento fornecido a esses himenópteros no ambiente (Motta *et al.* 2018).

Os inseticidas sintéticos piretróides são análogos ao composto natural piretrina, inicialmente identificado em flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (ordem: Asterales, família: Asteraceae) (Matsuda 2011). Eles são neurotóxicos, que atuam nos canais de sódio dos insetos ao prolongar a entrada de íons de Na⁺ nas células, isso faz com que o indivíduo apresente o sintoma de paralisia, seguido de sua morte (Soderlund & Bloomquist 1989, Ray & Fry 2006, Martínez *et al.* 2019).

Os piretróides são divididos em 2 grupos, Tipo I (ciano-3-fenoxibenzil+álcoois) e Tipo II (α -ciano-3-fenoxibenzil+álcoois), que se diferem pela presença do grupo α -ciano no Tipo II, os quais também possuem efeito sobre os canais de cálcio e cloreto. O inseticida lambda-cialotrina se enquadra como piretróide Tipo II, que tem a capacidade de penetrar rapidamente a membrana e

tecidos em função da sua natureza lipofílica. Resíduos deste composto já foram encontrados em néctar floral e grãos de pólen, logo, também pode afetar organismos não-alvo, como as abelhas (Nasuti *et al.* 2003, Razik 2019). Castro *et al.* (2020), por exemplo, mostraram que a exposição crônica a doses subletais de lambda-cialotrina causam impactos histopatológicos em células intestinais, nas glândulas hipofaríngeas e no cérebro de abelhas *A. mellifera*, assim, sendo capaz de interferir na fisiologia e no comportamento das abelhas.

O herbicida glifosato [N- (fosfonometil)glicina] também é fortemente associado ao declínio de abelhas, é um produto de amplo espectro utilizado globalmente, favorecido pelo avanço na tecnologia de plantas geneticamente modificadas, resistentes a este herbicida (Chen *et al.* 2022). Além disso, é comprovado que o glifosato reduz a capacidade de aprendizado associativo das abelhas (Herbert *et al.* 2014) e também altera sua microbiota intestinal (Motta *et al.* 2018), logo, esse pesticida prejudica funções importantes que essas bactérias exercem no processamento de alimento (Mukherjee 2009), na regulação do sistema imune (Corby-Harris *et al.* 2014), e na defesa contra patógenos (Koch & Schmid-Hempel 2011).

Diante do cenário descrito, nas últimas décadas é possível observar o avanço em pesquisas focadas em achar formas alternativas de controle para o manejo de insetos pragas. Dentre elas, os inseticidas botânicos à base de óleos essenciais, extratos ou compostos isolados têm se mostrado eficiente contra esses artrópodes e patógenos (Zhao *et al.* 2022). Essas substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas foram exploradas há cerca de 3.200 anos no Egito antigo e China, e 4.000 na Índia, para proteção de grãos armazenados (Venzon 2010). Apesar do conhecimento estabelecido sobre a atividade inseticida dos produtos naturais, somente nas últimas duas décadas que houve um aumento considerável nos estudos voltados ao uso desses compostos como biopesticidas botânicos, sendo os mais comuns os óleos essenciais, e as classes químicas isoladas piretrinas, nicotina e azadiractina (Oliveira *et al.* 2014).

A azadiractina (complexo limonóide tetranortriterpenoide) é o principal composto ativo do óleo de nim, sendo este um inseticida natural bem sucedido no mercado agrícola, extraído das sementes da árvore *Azadirachta indica* (ordem: Sapindales, família: Meliaceae) (Islas *et al.* 2020). Exerce bioatividade contra cerca de 600 insetos pragas (Hummel *et al.* 2014), e vale salientar que este produto também é permitido na agricultura orgânica (Raguraman, & Kannan 2014).

São vários os modos de ação da azadiractina, alguns deles são deterrência alimentar, efeito sobre o hormônio juvenil e ecdisteróide, e ainda bloqueia a formação de microtúbulos no momento de divisão ativa das células (Mordue Luntz & Blackwell 1993, Salehzadeh *et al.* 2003). Embora bastante utilizado para o controle de artrópodes pragas, pouca atenção é dada a respeito da atividade biológica da azadiractina sobre organismos não alvo, como os insetos polinizadores, principalmente em relação ao seu efeito sobre a fisiologia desses indivíduos (Isman 2020).

O limoneno é um composto amplamente utilizado nas indústrias de alimento, de cosmético, farmacêutica e agrícola (Jongedijk *et al.* 2015). Esta substância é classificada como um monoterpeno cíclico, e é o principal constituinte de plantas cítricas (Cheng *et al.* 2019). É considerado um inseticida seguro para ser utilizado no manejo de pragas, visto que apresenta baixa toxicidade a mamíferos, pássaros, e peixes, e aparentemente não exibe danos às abelhas (Ciriminna *et al.* 2014). Entretanto, a maioria dos estudos enfatizam a toxicidade e repelência do limoneno (Wei *et al.* 2008, Parra *et al.* 2013, Malacrinò *et al.* 2016), mas pouco se sabe sobre a ação deste inseticida natural sobre o sistema fisiológico e imunológico de abelhas e outros insetos benéficos.

Souza *et al.* (2023), por exemplo, recentemente identificaram alterações histopatológicas e histoquímicas no intestino médio de abelhas *Apis mellifera*, causadas pela exposição a CL₅₀ do limoneno (1,44 mL/100 mL solução 1:1 de mel+água destilada) e a concentração de 250 mL/100 mL (solução 1:1 de mel+água destilada) do inseticida botânico Azamax[®] (i.a. azadiractina). Devido a danos nas células, a absorção de nutrientes também foi prejudicada nas amostras deste estudo.

Assim, pesquisas que investigam o efeito dos produtos naturais sobre a fisiologia de organismos não-alvos, são fundamentais para garantir a segurança dos inseticidas botânicos quanto as abelhas.

Além de ser responsável pela absorção e armazenamento de nutrientes, o intestino médio dos insetos também configura uma das barreiras de defesa estrutural contra xenobióticos (Silva 2002). Quando as primeiras barreiras são rompidas, entram em ação os mecanismos de defesas celulares e humorais, cujas funções são desempenhadas, respectivamente, pelos hemócitos e proteínas solúveis presentes na hemolinfa (Cruz 2012).

A enzima fenoxidase é um componente importante das defesas humorais, com papel no reconhecimento de agentes estranhos e na formação de melanina (Silva 2002). Já o óxido nítrico (NO₂) se trata de outra molécula essencial para o reconhecimento de xenobióticos, além de ser citotóxica (Cerqueira & Yoshida.2002, Cervoni 2014). Há relatos que os produtos naturais podem causar alterações na atividade da fenoxidase e nos níveis de NO₂, desta forma, prejudicando o sistema imunológico dos insetos (Silva *et al.* 2019). Isto posto, se torna evidente que a seletividade dos inseticidas botânicos deve ser testada de forma isolada para cada inseto benéfico, pois mesmo que essas substâncias naturais não sejam letais a princípio, elas podem afetar negativamente a fisiologia e a imunologia do indivíduo a longo prazo.

A produção em excesso de NO₂ pode acabar sendo um problema para célula, isto porque, apesar da sua função de reconhecimento no sistema imune, o NO₂ também é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), que em conjunto com as espécies reativas de oxigênio (EROs), formam radicais livres capazes de gerar um estresse oxidativo (Sadekuzzaman *et al.* 2008). Em resposta a este estresse, a célula pode desencadear o processo de morte celular programada, chamado de apoptose, ou, em situações severas é provocada a sua necrose (Alburaki *et al.* 2017). Porém, quando o tecido epitelial sofre danos, ele ainda é capaz de se regenerar através da proliferação celular. Entrando,

sabe-se que a exposição aos defensivos agrícolas interfere de forma distinta em cada organismo (Forkpah *et al.* 2014).

Diante o exposto, este trabalho objetivou avaliar comparativamente o sistema imunológico de abelhas *A. mellifera* expostas a defensivos químicos naturais (composto Limoneno e Azamax[®] (inseticida botânico azadiractina)) e sintéticos (Karate[®] (inseticida piretroide lambda-cialotrina) e Roundup[®] (herbicida glifosato)), por meio da análise de apoptose e proliferação celular do intestino médio, como também por meio de testes de estresse oxidativo, da atividade da fenoloxidase e níveis de óxido nítrico. Esta dissertação foi dividida em quatro capítulos, no qual o Capítulo 1 consta uma introdução geral sobre a temática e o objetivo geral desta pesquisa. O Capítulo 2 contém o capítulo de livro intitulado “**Impactos de xenobióticos sobre as respostas imunológicas de abelhas**”, publicado pela editora Atena Editora, sob ISBN 978-65-258-0555-9 e DOI: [//doi.org/10.22533/at.ed.5592226085](https://doi.org/10.22533/at.ed.5592226085), onde foi elaborada uma revisão de literatura sobre o impacto de xenobióticos sobre a imunologia de abelhas *A. mellifera*. O Capítulo 3 é constituído pelo artigo “**Imunotoxicidade comparada de abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) expostas a xenobióticos naturais e sintéticos**”, a ser submetido à revista Apidologie, em que foi realizada uma comparação do sistema imunológico de *A. mellifera* exposta a xenobióticos naturais e sintéticos. Por fim, no Capítulo 4 é apresentado as considerações finais deste trabalho.

Literatura Citada

- Alburaki, M., S.J. Steckel, D. Chen, E. Mcdermott, M. Weiss, J.A. Skinner, H. Kelly, G. Lorenz, D.R. Tarpy, W.G. Meikle, J. Adamczyk & S.D. Stewart. 2017.** Landscape and pesticide effects on honey bees: forager survival and expression of acetylcholinesterase and brain oxidative genes. *Apidologie*. 48: 556–571
- Abdel Razik, M.A.A. 2019.** Toxicity and side effects of some insecticides applied in cotton fields on *Apis mellifera* *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26: 4987-4996.

- Carvalho, A.F. & M.A. Del Lama. 2015.** Predicting priority areas for conservation from historical climate modelling: stingless bees from Atlantic Forest hotspot as a case study. *Journal of Insect Conservation*. 19: 581–587.
- Castro, M.B.A. L.C. Martinez, J.F.S Cossolin, R.S. Serra & J.E. Serrão. 2020.** Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*. 248: 126075.
- Cerqueira, N.F., W.B. Yoshida.2002.** Nitric oxide: review. *Acta Cir Bras*. 17: 417-423.
- Cervoni, M.S. 2014.** Evidências para papel de óxido nítrico como regulador de vias de sinalização do desenvolvimento das castas de *Apis mellifera* L. (Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 47p.
- Ciriminna, R., M. Lomeli-Rodriguez, P. Demma Carà, J.A. Lopez-Sanchez & M. Pagliaro. 2014.** Limonene: A versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications*. 50: 15288–15296.
- Cheng, S., X. Liu, G. Jiang, J. Wu, J. Zhang, D. Lei, Y.J. Yuan, J. Qiao & G.R. Zhao. 2019.** Orthogonal engineering of biosynthetic pathway for efficient production of limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 8: 968–975.
- Chen, Y., J. Xu, X. Zheng, Q. Zhang, B. Wang, M. Zhao, C. Ye, P. Song, D. Yang & X. Lu. 2022.** Effects of glyphosate herbicide Roundup® on antioxidant enzymes activity and detoxification-related gene expression in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2022.2130455.
- Corby-Harris, V., L.A. Snyder, M.R. Schwan, P. Maes, Q.S. McFrederick & K.E. Anderson. 2014.** Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. *Appl Environ Microbiol*.80: 7460-7472.
- Cruz, L.C. 2012.** Proliferation, cell death and enzyme activity in the midgut of bees (Hymenoptera, Apidae) during metamorphosis. Tese (Doutorado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012. 71p.
- Feitosa, A.N.A., M.A.L. Freires, T.A.B. Sarmiento, L.M.A. Brito, R.L. Neta & P.B. Maracajá. 2020.** Produtos Apícolas e Saúde Humana: Uma Revisão Integrativa. *Braz. J. Produc. Eng*. 6: 34-44.
- Ferreira, S.N.I., D.M.B. Silva, F.C.M.A. Dias, A.A. Moreira. 2021.** Uma breve revisão sobre a utilização de abelhas como bioindicadores de contaminação ambiental: Ênfase na *Apis mellifera* L. *Revista Semiárido De Visu*. 9: 204–210.

- Forkpah, C., L.R. Dixon, S.E. Fahrbach & O. Rueppell. 2014.** Xenobiotic Effects on Intestinal Stem Cell Proliferation in Adult Honey Bee (*Apis mellifera* L) Workers. PLoS ONE. 9: 91180.
- Giannini, T.C., L.R. Tambosi, A.L. Acosta, R. Jaffé, A.M. Saraiva & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2015.** Safeguarding Ecosystem Services: A Methodological Framework to Buffer the Joint Effect of Habitat Configuration and Climate Change. PLoS ONE. 10: 0129225.
- Godfray, H.C.J., J.R. Beddington, I.R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J.F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S.M. Thomas & C. Toulmin. 2010.** Food security: The challenge of feeding 9 billion people. Science. 327: 812–818.
- Herbert, L.T., D.E. Vazquez, A. Arenas, W.M. Farina. 2014.** Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. The Journal of Experimental Biology. 217: 3457-3464.
- Hummel, H.E., S.S. Langner, G. Leithold, & H. Schmutterer. 2014.** Neem: Unusually versatile plant genus *azadirachta* with many useful and so far insufficiently exploited properties for agriculture, medicine, and industry. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 79: 211–228.
- Islas, J.F., E. Acosta, Z. G-Buentello, J.L. Delgado-Gallegos, M.G. Moreno-Treviño, B. Escalante, J.E. Moreno-Cuevas. 2020.** An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. Journal of Functional Foods. 74: 1756-4646.
- Isman, M.B. 2020.** Botanical insecticides in the twenty-first centuryfulfilling their promise? Annual Review of Entomology. 65: 233–249.
- Ipbcs, 2016.** The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, and H. T. Ngo, (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 p.
- Jongedijk, E., K. Cankar, J. Ranzijn, S. Van der Krol, H. Bouwmeester & J. Beekwilder. 2015.** Capturing of the monoterpene olefin limonene produced in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 32: 159–171.
- Koch, H. & P. Schmid-Hempel. 2011.** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. Proc Natl Acad Sci USA. 108: 19288–19292.
- Malacrinò, A., O. Campolo, F. Laudani & V. Palmeri. 2016.** Fumigant and repellent activity of limonene enantiomers against *Tribolium confusum* du Val. Neotropical Entomology. 45: 597–603.
- Martínez, L.C., A. Plata-Rueda, F.A. Rodríguez-Dimaté, J.M. Campos, V.C.D.S. Júnior, G.D.S. Rolim, F.L. Fernandes, W.M. Silva, C.F. Wilcken, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão.**

- 2019.** Exposure to insecticides reduces populations of *Rhynchophorus palmarum* in oil palm plantations with Bud Rot disease *Insects*. 10: 111.
- Matsuda, K. 2011.** Pyrethrin Biosynthesis and Its Regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Pyrethroids*. Springer. Berlin, Heidelberg. 314: 73-81.
- Nasuti, C., F. Cantalamessa, G. Falcioni & R. Gabbianelli. 2003.** Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats *Toxicology*. 191: 233-244.
- Motta, E.V.S., K. Raymann & N.A. Mora. 2018.** Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *PNAS*. 115: 41.
- Mordue Luntz, A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: An update. *Journal of Insect Physiology*. 39: 903–924.
- Moritz, R.F.A., S. Hartel & P. Neumann. 2005.** Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Ecoscience*, 12: 289-301.
- Mukherjee, I. 2009.** Determination of pesticide residues in honey samples. *Bull Environ Contam Toxicol*. 83: 818–821.
- Nasuti, C. F. Cantalamessa, G. Falcioni & R. Gabbianelli. 2003.** Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats *Toxicology*. 191: 233-244.
- Olinto, F.A., D.C. Silveira, D.C. Lima & P.B. Maracajá. 2015.** Comportamento higiênico em colmeias de *Apis mellifera* L. africanizadas no Sertão da Paraíba. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 10: 08-12.
- Oliveira, J.L., E.V.R. Campos, M. Bakshi, P.C. Abhilash & L.F. Fraceto. 2014.** Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*. 32: 1550-1561.
- Orr, M.C., A.C. Hughes, D. Chesters, J. Pickering, C.D. Zhu & J.S. Ascher. 2021.** Global Patterns and Drivers of Bee Distribution. Article. *Current Biology*. 31:451–458.
- Parra, L., A. Mutis, F. Ortega & A. Quiroz. 2013.** Field response of *Hylastinus obscurus* marsham (Coleoptera: Curculionidae) to E-2- hexenal and limonene, two host-derived semiochemicals. *Ciencia e Investigación Agraria*. 40: 637–642.
- Pereira, L.H., F.K.N. Barbosa, F.M. Oliveira, F.R.L. Caldas & P.S.S. Nascimento. 2019.** Effects of the use of pesticides on bees: a systematic review on scientific databases. *Brazilian Journal of Development*, 5(12), 32821–32833.

- Rader, R., I. Bartomeus, J.M. Tylianakis & E. Laliberte. 2014.** The winners and losers of land use intensification: pollinator Community disassembly is non-random and alters functional diversity. *Diversity and Distributions*. 20: 908-917.
- Raguraman, S. & M. Kannan. 2014.** Non-target effects of botanicals on beneficial arthropods with special reference to *Azadirachta indica*. *Adv. Plant Biopestic.* 1: 173–205.
- Ray, D.E. & J.R. Fry. 2006.** A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides *Pharmacol. Ther.* 111: 174-193.
- Sadekuzzaman, M., D. Stanley & Y. Kim. 2018.** Nitric Oxide mediates insect cellular immunity via Phospholipase A2 activation. *J. Innate Immun.* 10: 70–81.
- Salehzadeh, A., A. Akhka, W. Cushley, R.L.P. Adams, J.R. Kusel, & R.H.C. Strang. 2003.** The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 681–689.
- Samson-Robert, O., M. Labrie, M. Chagnon, & V. Fournier. 2014.** Neonicotinoid-contaminated puddles of water present a risk of intoxication for honey bees. *PLoS One*. 9: 108443.
- Silva, C.T.S., V.W. Teixeira, G.S. Cruz, F.M. Cunha & A.A.C. Teixeira. 2019.** Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. *Austral Entomol.* 59: 215-224.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, DF*. 24: 68 – 72.
- Silva, C.I., K.P. Aleixo, B. Nunes-Silva, B.M. Freitas & V.L. Imperatriz-Fonseca. 2014.** Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. São Paulo: Instituto de Estudos Ambientais. 7p.
- Soderlund, D.M. & J.R. Bloomquist. 1989.** Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 77 – 96.
- Souza, C.O., V.W. Teixeira, G.S. Cruz, C.A. Guedes, J.C.S. Nascimento & A.A.C. Teixeira, 2023.** Toxicology, Histophysiological and Nutritional Changes in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submitted to Limonene and Natural Pesticides in Comparison to Synthetic Pesticides. *J. Apic. Res.* doi.org/10.1080/00218839.2023.2166229.
- Tester, M. & Langridge, P. 2010.** Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327: 818–822.
- Vanbergen, A. J. 2013.** Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 11: 251–259.

- VanEngelsdorp, D., R.M. Underwood, D.M. Caron & J. Hayes. 2007.** An Estimate of Managed Colony Losses in the Winter of 2006 - 2007: A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*. 147: 599-603.
- Venzon, M. 2010.** Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: EPAMIG, 30, 1-4.
- Wei, J.R., Z.Q. Yang, H.L. Hao & J.W. Du. 2008.** R)-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetles. *Agricultural and Forest Entomology*. 10: 323-330.
- Williams, G.R., D.R. Tarpy, D. VanEngelsdorp, M.P. Chauzat, D.L. Cox-Foster, K.S. Delaplane, P. Neumann, J.S. Pettis, R.E. Rogers & D. Shutler. 2010.** Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays*. 32: 845-846.
- Zhao, J., D. Liang, W. Li, X. Yan, J. Qiao & Q. Caiyin. 2022.** Research Progress on the Synthetic Biology of Botanical Bioengineering. 9: 207.

CAPÍTULO 2
IMPACTOS DE XENOBIÓTICOS SOBRE AS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DE
ABELHAS ¹

FERNANDO H. B. MELO¹, VALÉRIA W. TEIXEIRA², CLAUDIO A. G. CAMARA³, ÁLVARO A. C.
TEIXEIRA², GLAUCILANE S. CRUZ¹, CATIANE O. SOUZA¹, VANESKA B. MONTEIRO¹, MARCILIO M.
MORAES³, ISMAELA, MARIA F. MELO², DARCLET T. M. SOUZA⁴ E JÚLIO C. S. NASCIMENTO⁴

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 Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁴Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹ Melo F.H.B., V.W. Teixeira, C.A.G. Camara, Á.A.C. Teixeira, G.S. Cruz, C.O. Souza, V.B. Monteiro, M.M. Moraes, I.M.F. Melo, D.T.M. Souza & J.C.S. Nascimento. Impactos de Xenobióticos Sobre as Respostas Imunológicas de Abelhas. Atena Editora.

RESUMO - As abelhas são insetos que cumprem um papel ecossistêmico importante no que se refere à reprodução e biodiversidade de plantas. Mesmo assim, nos últimos anos tem se observado o declínio generalizado desses polinizadores. A perda desses animais é causada devido a interação simultânea de diversos fatores estressores, um deles está relacionado a exposição das abelhas aos resíduos de xenobióticos utilizados no controle de pragas. Esses compostos podem afetar desde as barreiras físicas de proteção como também as defesas celulares e humorais desses insetos que possuem um mecanismo imune complexo baseado no indivíduo e na colônia (respostas imunes sociais). Compreender a dinâmica do sistema imunológico das abelhas frente a essas substâncias, auxilia na compreensão de como os xenobióticos estão afetando o declínio de abelhas, e assim, beneficia o desenvolvimento de políticas de proteção para esses organismos que são vitais ao equilíbrio do ecossistema. Pensando nisso, foi elaborada uma revisão de literatura entre o período de fevereiro a maio de 2022, tendo como temática o impacto de xenobióticos sobre a saúde de abelhas. A seleção dos artigos científicos utilizados foi realizada por meio de banco de dados como Scielo, Google acadêmico, Science direct, PubMed, Periódicos da Capes e Web of Science. Portanto, esta pesquisa tem o intuito de reunir informações relevantes sobre o funcionamento do sistema imunológico de abelhas frente aos xenobióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Declínio de polinizadores, abelhas, xenobióticos, imunologia

IMPACTS OF XENOBIOTICS ON THE IMMUNOLOGICAL RESPONSES OF BEES

ABSTRACT – Bees are insects that play an important ecosystem role in terms of plant reproduction and biodiversity. Even so, in recent years there has been a general decline of these pollinators. The loss of these animals is caused due to the simultaneous interaction of several stressors, one of which is related to the exposure of bees to xenobiotic residues used in pest control. These compounds can affect from the physical barriers of protection as well as the cellular and humoral defenses of these insects that have a complex immune mechanism based on the individual and the colony (social immune responses). Understanding the dynamics of the bee's immune system against these substances helps to understand how xenobiotics are affecting the decline of bees, and thus, benefits the development of protection policies for these organisms that are vital for the balance of the ecosystem. With this in mind, a literature review was prepared between the period from February to May 2022, having as a theme the impact of xenobiotics on the bees's health. The selection of the scientific articles used was carried out through databases such as Scielo, Google academic, Science direct, PubMed, Capes Periodicals and Web Science. Therefore, this research aims to gather relevant information about the functioning of the immune system of bees against xenobiotics.

KEY WORDS: Decline of pollinators, bees, xenobiotics, immunology

Introdução

Durante milhões de anos as abelhas coevoluíram com as plantas. São protagonistas no processo de polinização e se relacionam diretamente com as flores e outras partes específicas. Esses herbívoros especializados causam pouco ou nenhum dano aos hospedeiros; existindo um benefício mútuo entre reinos, onde é relatado aproximadamente 20 mil espécies, entre elas solitárias e sociais, que se relacionam com mais de 100 mil espécies botânicas (Michener 2000, Orr *et al.* 2021). Além do pólen e néctar, são coletados óleos florais viscosos, resinas e aromas de determinadas espécies vegetais (Sipes & Tepedino 2005, Danforth 2007). Elas polinizam aproximadamente 80% das plantas cultivadas e embora exista a necessidade de mais estudos para quantificar a relação com as plantas silvestres, estima-se que estão associadas com 90% das angiospermas (Danforth 2007, Raiza abati *et al.* 2021).

Apesar do valor desses himenópteros para o equilíbrio de funções ecossistêmicas, nos últimos anos diversos fatores estão sendo relatados como causadores de um declínio abrupto observado em populações de todos os continentes (Souza *et al.* 2021). O uso indiscriminado de químicos sintéticos e naturais utilizados na indústria agrícola se trata de um agente estressor importante. Os estudos a seu respeito são focados principalmente nos agrotóxicos sintetizados, talvez pela grande geração de resíduos que levam a modificações na comunidade de espécies de uma região ou até mesmo pela crença equivocada de que os produtos naturais não são prejudiciais ao ambiente (Gong & Diao 2017, Isman 2020).

Uma cientometria desenvolvida por Raiza abati *et al.* (2021) demonstra que a partir de 2006 houve um aumento progressivo da média de citações de trabalhos cuja temática envolvia os impactos de agroquímicos sobre as abelhas, com uma elevação brusca das publicações a datar de 2010. Este contexto foi estabelecido, em parte, devido ao distúrbio do colapso das colônias (CCD)

documentado pela primeira vez na América do Norte, que deixou um forte alerta para a ciência e a comunidade direcionado a conservação desses polinizadores (Souza *et al.* 2021).

Os insetos possuem barreiras mecânicas e fisiológicas contra os xenobióticos, porém as espécies podem apresentar respostas distintas a cada substância (Mayack *et al.* 2022), logo, entender a dinâmica das abelhas frente a esses compostos auxilia na compreensão de como os pesticidas estão afetando o declínio de colônias, e assim ajuda a desenvolver políticas de proteção. Portanto, este trabalho tem por objetivo fornecer uma revisão de literatura que reúna informações sobre a atividade imunológica de abelhas expostas a xenobióticos.

Material e Métodos

Este estudo compreende uma revisão de literatura realizada entre os meses de fevereiro a maio de 2022, onde a bibliografia utilizada partiu de um recorte temporal entre 1963 a 2022. Foram usados estudos acadêmicos já existentes, boletins de empresas, artigos em jornais de grande circulação, agências públicas e privadas. A seleção dos artigos científicos foi realizada por meio de banco de dados como Scielo, Google acadêmico, Science direct, Pubmed, Periódicos da Capes e Web Science. A busca foi realizada com emprego de nomenclaturas utilizadas por profissionais das ciências agrárias, ambientais e ecológicas em português e inglês.

Respostas imunológicas dos insetos

Xenobiótico é todo composto estranho capaz de causar reações adversas no organismo (Gallo 2008). Existem aqueles que são sintetizados em laboratório, fazendo parte desses produtos os inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, e outros cuja principal função é a prevenção ou controle das pragas. São moléculas eficazes e em grande parte com um grau de segurança. Contudo, a constante aplicação inadequada com superdosagens, tem favorecido o desenvolvimento

de populações de insetos pragas resistentes, causando, desta forma, um grande acúmulo de resíduos em ambientes rurais e urbanos, podendo contribuir como um dos fatores responsáveis para a mortalidade das abelhas (Hrynko *et al.* 2021).

Os xenobióticos naturais podem ser extratos ou óleos essenciais obtidos de diversas espécies de plantas, e são produzidos via metabolismo secundário dos vegetais. São misturas complexas de compostos químicos, que exercem a função de defesa nas plantas contra artrópodes pragas e patógenos; além de cumprir um importante papel em processos reprodutivos, através da produção de substâncias voláteis atrativas a polinizadores e animais que propagam sementes (Regnault-Roger *et al.* 2012).

Esses produtos naturais são alvo de estudos com a pretensão de empregá-los no manejo de insetos praga, porém, as pesquisas até o momento são limitadas na compreensão de como essas substâncias afetam os indivíduos não alvo, tais como os inimigos naturais e os polinizadores, principalmente no que diz respeito a possíveis impactos nas respostas fisiológicas desses animais (Isman 2006, Isman 2020).

A primeira barreira de defesa dos insetos contra essas moléculas estranhas, como também contra os microrganismos patogênicos e inimigos naturais, é composta pelo tegumento (estrutura e composição da cutícula), o sistema respiratório e o digestório (matriz peritrófica e o epitélio). A imunidade natural desses artrópodes é constituída por uma série de mecanismos, a começar pelas reações de reconhecimento, sendo esta uma habilidade essencial para o sistema imunológico de qualquer organismo (Dunn 1986, Chapman 2013).

A ativação da cascata pro-fenoloxidase é um dos mediadores no processo de reconhecimento da partícula estranha, onde compostos fenólicos encontrados na hemolinfa e na cutícula são oxidados através da catalização da enzima fenoloxidase, cujo produto final da reação é a melanina que está envolvida na esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas dos

insetos (Ashida *et al.* 1983, Brookman *et al.* 1989, Rowley *et al.* 1990, Marmaras *et al.* 1993, Lee *et al.* 1999, Silva *et al.* 2000).

O óxido nítrico é uma molécula gasosa extremamente instável e reativa (Alderton *et al.* 2001) que também faz parte de diversos mecanismos do sistema imunológico e exerce a função de sinalização facilitada pela sua alta permeabilidade entre as membranas celulares, se tornando um transmissor de informações eficiente. Ele também demonstra atividade citotóxica e ajuda na ativação e formação do encapsulamento e nodulação, e possui alta atividade no sistema adiposo e hemocele (Rivero 2006, Sadekuzzaman *et al.* 2018).

Os insetos se protegem por meio de defesas humorais e celulares. A primeira resposta é proporcionada por proteínas solúveis presentes na hemolinfa, que demoram cerca de horas ou dias para expressão total. Em muitos casos essas moléculas proteicas apresentam propriedades antimicrobianas, isso pode ser exemplificado pela síntese de peptídeos antibacterianos em grupos de lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros induzidos por injeções de bactérias ou mesmo devido a ferimentos (Cociancich *et al.* 1994).

A fagocitose, o encapsulamento e a formação de nódulos são mediados pela melanização e fazem parte das defesas celulares através da atuação dos hemócitos presentes na hemocele, algumas células hemocitárias são os granulócitos, os plasmátocitos, adipohemócitos, esferulócitos, entre outras. Elas circulam livremente na hemolinfa, porém migram rapidamente para o local de infecção quando ocorre a contaminação e possivelmente fagocitam os compostos estranhos ou patógenos (Silva *et al.* 2000, Russo *et al.* 2001, Silva *et al.* 2002). Os plasmátocitos são os primeiros hemócitos que agem no local contaminado sendo responsáveis pela fagocitose, na sequência os granulócitos mediam a formação de nódulos para imobilização e remoção de circulação das partículas estranhas. Caso a fagocitose ou o isolamento em nódulos não sejam capazes de deter a infecção, os insetos também podem se defender pela formação de cápsulas

através dos plasmatócitos (Strand & Pech 1995). Dentro dessas estruturas os patógenos podem morrer por asfixia ou pela concentração de substâncias tóxicas (Silva *et al.* 2002).

Resposta imunológica de abelhas frente a xenobióticos

A imunidade das abelhas é estruturada a nível individual e social. O sistema imune social está associado a mecanismos complexos tais como o comportamento específico de higienização sobre a colônia, por exemplo, a glicose oxidase (GOX) que é expressa principalmente nas glândulas hipofaríngeas, e tem a função de catalisar a reação de oxidação de β -D-glicose com propriedades antissépticas como o peróxido de hidrogênio. A esterilização do alimento da colmeia decorre da secreção dos produtos antissépticos no substrato da larva e no mel, assim, a atividade de GOX previne a contaminação das abelhas a nível de grupo (White *et al.* 1963, Ohashi *et al.* 1999).

Como resposta imune individual, as substâncias tóxicas podem ser metabolizadas pelos insetos através de enzimas como as esterases, glutathione S-transferase e as monooxigenases da família citocromo P450, logo, elas também são responsáveis pelo desenvolvimento da resistência metabólica em insetos. Em abelhas, o citocromo P450 atua, por exemplo, na desintoxicação efetiva dos neonicotinóides do grupo ciano (Iwasa *et al.* 2004), porém o mesmo não ocorre com os do grupo nitro (Suchail *et al.* 2004), o que demonstra que essa interação entre inseticidas e enzimas desintoxicadoras são dinâmicas e precisam ser analisadas para cada produto.

Outro fator que pode influenciar negativamente o metabolismo dessas moléculas é o sinergismo entre compostos que aumentam a toxicidade em abelhas, como demonstrado por Zhu *et al.* (2017) onde o fungicida Domark (tetraconazol), inibidor da via metabólica, teve efeito sinérgico e aumentou significativamente a toxicidade do inseticida Advise (imidaclopride) sobre as abelhas. Eles também observaram que a sinergia entre compostos pode alterar a imunidade dos indivíduos

impactando na enzima fenoloxidase, onde a interação entre Advise+Vydate (carbamato) ocasionou sua redução.

Em comparação aos insetos solitários, as abelhas dispõem de apenas um terço do número de genes relacionados a resposta imune que se é conhecido (Evans *et al.* 2006), e o trabalho de Alaux *et al.* (2010a) com *Apis mellifera* Linnaeus sugere que elas investem mais recursos na imunidade social em detrimento da individual. Desta forma, as abelhas podem ser consideradas mais sensíveis ao contato com os xenobióticos durante o forrageamento, além disso, estudos já demonstram a contaminação das abelhas através de doses subletais de resíduos de pesticidas nas colmeias, logo, toda a colônia é afetada (Motta *et al.* 2020).

A exposição a multifatores estressores é a hipótese mais aceita para explicar o declínio desses polinizadores (Souza *et al.*, 2021), neste sentido, na tentativa de simular o cenário que é encontrado no campo, Alaux *et al.* (2010b) mostraram que abelhas *A. mellifera* tendem a ter um maior investimento na imunidade social quando expostas ao fungo entomopatogênico *Nosema*, que é utilizado no Manejo Integrado de Pragas, em associação com o inseticida imidaclopride. A contaminação por ambos estressores levou a maior mortalidade das abelhas, porém não alterou os níveis de fenoloxidase ou a contagem total de hemócitos quando comparado aos tratamentos de controle, apenas na contaminação com o fungo, ou ainda somente o imidaclopride, interferiu nos teores de GOX. Esses resultados sugerem um trade-off entre imunidade social e individual, e corrobora com a hipótese que se as respostas imunes sociais forem menos custosas e mais eficazes para a defesa, então a pressão seletiva irá favorecer a imunidade coletiva (Cremer *et al.* 2007).

Os xenobióticos, sejam sintéticos ou naturais, também podem exercer influência sobre processos fisiológicos a nível celular. O aumento do estresse oxidativo, por exemplo, pode ser desencadeado pela exposição a pesticidas (Alburaki *et al.* 2017) e é ocasionado pela incapacidade dos mecanismos antioxidantes naturais do organismo lidarem com a produção excessiva de

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN) (Velki *et al.* 2010, Nishida 2011). Os danos oxidativos gerados por ERO e ERN são preocupantes por ocasionar danos em estruturas fundamentais das células e tecidos levando a uma morte celular programada ou não, chamada de apoptose ou necrose, respectivamente (Jabłońska-trypuć 2017, Ali *et al.* 2018).

As abelhas são expostas constantemente a doses subletais de pesticidas, e há relatos sobre as consequências da apoptose instigada por essa exposição, os efeitos podem ser vistos em danos celulares no intestino médio, gônadas ou até mesmo a degeneração neuronal no cérebro (Gregorc & Bowen, 2000, Wu *et al.* 2015, Gregorc *et al.* 2018).

O estresse oxidativo elevado atingem negativamente as abelhas a nível individual, no entanto, esse efeito generalizado pode ser repercutido sobre a colmeia levando ao declínio da colônia (Perry *et al.* 2015). Outro radical importante que acaba se tornando deletério em decorrência do estresse oxidativo é o óxido nítrico. O mecanismo de produção do óxido nítrico nos insetos é ativado imediatamente após o contato com as substâncias tóxicas. As células ativam o gene para a síntese do óxido nítrico, assim, se inicia sua produção em elevadas concentrações se tornando tóxico para própria célula, logo, essa síntese é regulada de forma tardia para alcançar a eficácia na ação de desintoxicação sem acompanhar o efeito tóxico ou deletério sobre o tecido celular do animal (Sadekuzzaman *et al.* 2018).

Os xenobióticos são capazes de alterar a regulação dos níveis de óxido nítrico, Bartling *et al.* (2021), por exemplo, utilizaram marcadores de níveis gerais de estresse oxidativo em *A. mellifera* e quantificaram as elevações desse radical livre em abelhas expostas a um inseticida (tiaclopride), um herbicida (pendimetalina), dois fungicidas (fludioxonil e dimoxistrobina) e um patógeno (*Pseudomonas entomophila*), e como consequência, todos os agentes estressores diminuíram o tempo de vida, a saúde e o fitness desses insetos.

Sabe-se ainda que os xenobióticos tem implicações sobre a capacidade de proliferação celular do organismo. O epitélio do intestino médio das abelhas, por exemplo, é preservado devido a proliferação de células-tronco durante toda sua vida, e Forkpah *et al.* (2014) mostraram que diversos xenobióticos (colchicina, metoxifenoazida, tetraciclina e uma combinação de coumafós+tau-fluvalinato) influenciaram negativamente na taxa de proliferação dessas células em *A. mellifera*. O contexto social que essas abelhas estão inseridas, ou seja, o compartilhamento do mesmo recurso/substrato faz com que haja uma contaminação coletiva, resultando no enfraquecimento da colônia. insetos e os seres humanos tornaram-se tão conectados pela pesquisa que em todas as áreas tecnológicas da mais básica até a mais avançada, os insetos são utilizados como modelo para estudos (James 2004).

No Brasil, a maioria dos estudos sobre a evolução de espécies e genética de populações emprega a mosca doméstica, *Musca domestica* L. ou *Drosophila* spp. o que não difere das pesquisas realizadas no resto do mundo (Cameron *et al.* 1989, Diaz & Tilte 2000).

Conclusão

Diante do exposto, entende-se que os xenobióticos podem afetar os processos fisiológicos e imunológicos das abelhas de diversas formas, e entendê-los é crucial para a confirmação da segurança de que um xenobiótico usado para o controle de pragas não será seletivo aos organismos não alvos.

Literatura Citada

Abati, R., A.R. Sampaio, R.M.A. Maciel, F.C. Colombo, G. Libardoni, L. Battisti, E.R. Lozano, N.C. Ghisi, F.M. Costa-Maia & M. Potrich. 2021. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28: 32282-32298.

- Alaux, C., J.L. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, M. Cousin, J. Brillard, A. Baldy, L. Belzunces & C.Y. Le. 2010b.** Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12: 774-82.
- Alaux, C., F. Ducloz, D. Crauser, C.Y. Le. 2010a.** Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6: 562–565.
- Alburaki, M., S.J. Steckel, D. Chen, E. Mcdermott, M. Weiss, J.A. Skinner, H. Kelly, G. Lorenz, D.R. Tarpy, W.G. Meikle, J. Adamczyk & S.D. Stewart. 2017.** Landscape and pesticide effects on honey bees: forager survival and expression of acetylcholinesterase and brain oxidative genes. *Apidologie.* 48: 556–571.
- Alderton, W.K., C.E. Cooper & R.G. Knowles. 2001.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.* 357: 593–615.
- Ali, D., A. Tripathi, H.A. Ali, Y. Shahi, K.K. Mishra, S. Alarifi, A.A. Alkahtane & S. Manohardas. 2018.** ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells. *Onco Targets Ther.* 11: 489-497.
- Ashida, M., Y. Ishizaki & H. Iwahana. 1983.** Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or b-1,3-gulcans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 562-564.
- Bartling, M.T., S. Thümecke & J.H. Russert. 2021.** Exposure to low doses of pesticides induces an immune response and the production of nitric oxide in honeybees. *Sci Rep.* 11: 6819.
- Brookman, J.L., A.F. Rowley & N.A. Ratcliffe. 1989.** Studies on nodule formation in locust following injection of microbial products. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 315-323.
- Cociancich, S., P. Bulet, C. Hetru & J.A. Hoffmann. 1994.** The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol. Today.* 10: 132-139.
- Chapman, R. F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Cremer, S., S.A. Armitage & P. Schmid-Hempel. 2007.** Social immunity. *Curr. Biol.* 17: 693–702.
- Danforth, B. 2007.** Bees. *Curr. Biol.* 17: 156–161.
- Dunn, P.E. 1986.** Biochemical aspects of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 31: 321-339.
- Evans, J.D., K. Aronstein, Y.P. Chen, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G.J. Thompson, Z. Zou & D. Hultmark. 2006.** Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15: 645-656.

- Forkpah, C., L.R. Dixon, S.E. Fahrbach & O. Rueppell. 2014.** Xenobiotic Effects on Intestinal Stem Cell Proliferation in Adult Honey Bee (*Apis mellifera* L) Workers. PLoS ONE. 9: 91180.
- Gallo, M. A. 2008.** History and scope of toxicology. Unit 1 General principles of toxicology. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 126p.
- Gong, Y & Q. Diao. 2017.** Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. Springer Science Business. 26: 1-12.
- Gregorc, A., M. Alburaki, N. Rinderer, B. Sampson, P.R. Knight, S. Karim & J. Adamczyk. 2018.** Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. Sci Rep. 8: 15003.
- Gregorc, A & I. D. Bowen. 2000.** Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with Paenibacillus larvae, Amitraz and Oxytetracycline. Cell Biol Int. 24: 319–324.
- Hrynko, I., P. Kaczyński & B. Łozowicka. 2021.** A global study of pesticides in bees: QuEChERS as a sample preparation methodology for their analysis – Critical review and perspective. Sci Total Environ. 792: 148385.
- Isman, M. B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45–66.
- Isman, M. B. 2020.** Botanical Insecticides in the Twenty-First Century — Fulfilling their promise?. Annu. Rev. Entomol. 65: 233-249.
- Iwasa, T., N. Motoyama, J.T. Ambrose & M.R. Roe. 2004.** Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protect. 23:371±378.
- Jabłońska-Trypuć, A. 2017.** Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. React Oxyg Species. 3: 96–110.
- Lee, H.S., M.Y. Cho, K.M. Lee, T.H. Kwon & B.L. Lee. 1999.** The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. FEBS Letter. 444: 255-259.
- Marmaras, V.J., S.N. Bournazos, P.G. Katsoris & M. Lambropoulou. 1993.** Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for non self recognition and immobilization of Escherichia coli in the cuticle of developing Ceratitis capitata. Arch. Insect Biochem. Physiol. 23: 169-180.
- Mayack, C., A. Macherone, A.G. Zaki, E. Filiztekin, B. Özkazanç, Y. Koperly, S.J. Schick, E.J. Eppley, M. Deb, N. Ambiel, A.M. Schafsnitz & R.L. Broadrup. 2022.** Environmental exposures associated with honey bee health. Chemosphere. 286: 131948.

- Michener, C.D. 2000.** The Bees of the World. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Motta, E.V.S., M. Mak, T.K. Jong, J.E. Powell, A. O'donnell, K.J. Suhr, I.M. Riddington & N.A. Moran. 2020.** Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Appl Environ Microbiol.* 86: 115020.
- Nishida, Y. 2011.** The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatsh Chem.*142: 375–384.
- Ohashi, K., S. Natori, T.A. Kubo. 1999.** Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem.* 265: 127–133.
- Orr, M.C., A.C. Hughes, D. Chesters, J. Pickering, C.D. Zhu & J.S. Ascher. 2021.** Global Patterns and Drivers of Bee Distribution. Article. *Current Biology.* 31:451–458.
- Perry, C.J., E. Søvik, M.R. Myerscough & A.B. Barron. 2015.** Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *PNAS.* 112: 3427–3432.
- Regnault-roger, C., C. Vincent & J.T. Arnason. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol.* 57: 405–424.
- Rivero, A. 2006.** Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.* 22: 219-225.
- Rowley, A.F., J.L. Brookman, & N.A. Ratcliffe. 1990.** Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *Journal Invertebrate Pathology.* 56: 31-38.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal Insect Physiology.* 47: 167- 172.
- Sadekuzzaman, M., D. Stanley & Y. Kim. 2018.** Nitric Oxide mediates insect cellular immunity via Phospholipase A2 activation. *J. Innate Immun.* 10: 70–81.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, DF.* 24: 68 – 72.
- Silva, C., B.D. Gary & M.E. 2000.** Rau. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental Comparative Immunology.* 24: 367-379.
- Sipes, S.D. & A.V.J. 2005.** Tepedino. Pollenhost specificity and evolutionary patterns of host switching in a clade of specialist bees (Apoidea: *Diadasiinae*). *Biol. J. Linn. Soc.* 86: 487–505.

- Souza, C.O., V.W. Teixeira, A.A.C. Teixeira, G.S. Cruz, C.A. Guedes, J.C.S. Nascimento & Teixeira, C.S. 2021.** Consequences of the excessive use of agricultural defensives in bees: one of the probable causes of CCD. Editora Atena, 53p.
- Suchail, S., G. Sousa, R. Rahmani & L.P. Belzunces. 2004.** In vivo distribution and metabolism of ¹⁴Cimidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. Pest Manag Sci. 60: 1056±1062.
- Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995.** Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annual Review Entomology. 40: 31-56.
- Vannette, R.L., A. Mohamed & B.R. Johnson. 2015.** Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. Scientific Reports. 5: 16224p.
- Velki, M., D. Kodri'k, J. Večera, B.K. Hackenberger & R. Socha. 2011.** Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. Gen Comp Endocrinol. 172: 77–84.
- White, J.W.J., M.H. Subers & A.I. Schepartz. 1963.** The identification of inhibine, antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide, and its origin in a honey glucose oxidase system. Biochem Biophys Acta. 73: 57–70.
- Wu, Y.Y., T. Zhou, Q. Wang, P.L. Dai, S.F. Xu, H.R.E. Jia & X. Wang. 2015.** Programmed Cell Death in the Honey Bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) Worker Brain Induced by Imidacloprid. J Econ Entomol. 108: 1486–1494.
- Zhu, Y.C., J. Yao, J. Adameczyk & R. Luttrell. 2017.** Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). PLoS ONE. 12: 0176837p.

CAPÍTULO 3

IMUNOTOXICIDADE COMPARADA DE ABELHAS *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) EXPOSTAS A XENOBIÓTICOS NATURAIS E SINTÉTICOS ¹

FERNANDO H. B. MELO¹, VALÉRIA W. TEIXEIRA², CLAUDIO A. G. CAMARA³,
CATIANE O. SOUZA¹, GLAUCILANE S. CRUZ¹, LEUCIO DUARTE VIEIRA FILHO⁴
VANESKA B. MONTEIRO¹, MARCILIO M. MORAES³, 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 Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁴Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹ Melo F.H.B., V.W. Teixeira, C.A.G. Camara, Á.A.C. Teixeira, G.S. Cruz, C.O. Souza, L.D. Vieira-Filho, V.B. Monteiro & M.M. Moraes. Imunotoxicidade Comparada de Abelhas *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Expostas a Xenobióticos Naturais e Sintéticos. A ser submetido.

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de defensivos químicos naturais com os sintéticos, assegurando, desta forma, a suposta seletividade desses compostos naturais sobre as abelhas *Apis mellifera*. As CL₅₀ utilizadas nos bioensaios são oriundas do trabalho de Souza et al. 2023, sendo elas: composto Limoneno (1.440 µL/100 mL), Karate® (13,4 µL/100 mL) e Roundup® (712.290 µL/100 mL), exceto o Azamax®, pois concentrações acima de 250 µL/100 mL causaram repelência e abaixo, não promoveram mortalidades. Essas CL₅₀ e a concentração de 250 µL/100 mL de Azamax® foram utilizadas em análises imunohistoquímicas utilizando o método de Tunel e PCNA no intestino médio das abelhas, e em avaliações imunológicas (óxido nítrico, fenoxidase e estresse oxidativo (TBARS e GSH) em operárias adultas. Os tratamentos com os xenobióticos não revelaram apoptose e proliferação celular. Porém, observou-se degeneração de epitélio com presença de células vacuolizadas, sugerindo processo necrótico. Com exceção do composto Limoneno, todas as substâncias ocasionam estresse oxidativo pelo aumento do TBARS. Não houve diferenças nos níveis de GSH nos tratamentos com os xenobióticos em relação ao controle. Verificou-se ainda alterações no sistema imunológico desses insetos, em decorrência do aumento da atividade da enzima fenoxidase e nos níveis de NO₂. Com os resultados adquiridos, é possível concluir cautela na utilização dos defensivos químicos na agricultura, seja ele de origem sintética ou natural, pois ocasionaram danos histopatológicos e imunológicos irreversíveis. Este trabalho também chama atenção para a necessidade de estudos mais detalhados a respeito dos produtos naturais sobre a fisiologia de insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Polinizadores, Pesticidas, Imunohistoquímica, Fenoxidase, Óxido Nítrico, Intestino médio, Estresse oxidativo

COMPARATIVE IMMUNOTOXICITY OF *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) BEES
EXPOSED TO NATURAL AND SYNTHETIC XENOBIOTICS

ABSTRACT – The objective of this work was to compare the effect of natural and synthetic chemical pesticides, thus ensuring the supposed selectivity of these natural compounds on *Apis mellifera* bees. The LC₅₀ used in the bioassays come from the work of Souza *et al.* 2023, and are: compound Limonene (1,440 µL/100 mL), Karate® (13.4 µL/100 mL) and Roundup® (712,290 µL/100 mL), except for Azamax®, as concentrations above 250 µL/100 mL caused repellency and below, did not promote mortalities. These CL₅₀ and the concentration of 250 µL/100 mL of Azamax® were used in immunohistochemical analyzes using the Tunel method and PCNA in the midgut of bees, and in immunological evaluations (nitric oxide, phenoloxidase and oxidative stress (TBARS and GSH)) in adult workers. Treatments with xenobiotics did not reveal apoptosis and cell proliferation. However, epithelial degeneration was observed with the presence of vacuolated cells, suggesting a necrotic process. With the exception of the Limonene compound, all substances cause oxidative stress by increasing TBARS. There were no differences in the levels of GSH. There were also alterations in the immune system of these insects, due to the increase in the activity of the enzyme phenoloxidase and in the levels of NO₂. With the results acquired, it is possible to conclude caution in the use of chemical pesticides in agriculture, whether of synthetic or natural origin, as they caused irreversible histopathological and immunological damage. This work also draws attention to the need for more detailed studies of natural products on physiology of insects.

KEY WORDS: Pollinators, Pesticides, Immunohistochemistry, Phenoloxidase, Nitric Oxide, Midgut, Oxidative stress

Introdução

As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) se evidenciam no ecossistema pelo seu papel na polinização, no qual é exercido espontaneamente em ambientes naturais e antropomorfizados. Elas promovem o deslocamento de partículas celulares reprodutivas, e assim, sustentam a variabilidade genética das espécies vegetais naturais e cultivadas (Klein *et al.* 2007, Michener 2007, Eardley *et al.* 2016). Artrópodes de acentuada importância, portanto, participam intrinsecamente da manutenção da existência de inúmeros organismos vivos na terra (Eardley *et al.* 2016). Apesar da relevância ambiental e econômica (Giannini *et al.* 2015) desses organismos, nos últimos anos tem se relatado o declínio de populações de abelhas, bem como da riqueza de espécies em todos os continentes (Zattara & Aizen 2021).

Os defensivos agrícolas impactam as populações das abelhas de diversas formas, e é apontado como um dos multifatores que geram o fenômeno conhecido como Distúrbio do Colapso de Colônias (Colony Collapse Disorder- CCD), que atinge abelhas sociais do gênero *Apis* e nativas (Graystock *et al.* 2013, Goulson *et al.* 2015). Inseticidas neurotóxicos como os neonicotinóides e piretróides, por exemplo, apresentam toxicidade, e quando não são letais ainda são capazes de causar modificações comportamentais em operárias (Decourtye *et al.* 2005, Gill & Raine. 2014). Além disso, o herbicida glifosato, que é amplamente utilizado na agricultura, reduz a capacidade de aprendizado das abelhas (Herbert *et al.* 2014).

Do ponto de vista imunológico, Gregorc & Ellis (2011) testaram os defensivos químicos organofosforado, neonicotinóide e o herbicida glifosato sobre larvas de *A. mellifera*, e verificaram o aumento de apoptose no intestino médio, nos quais apresentaram respectivamente 65, 61 e 69% de morte celular nas larvas tratadas em comparação a 10% do grupo controle, desta forma, os pesticidas exercem efeito a nível celular. A apoptose é o processo de morte celular programada, que ocorre naturalmente nos organismos, para manutenção da homeostase da célula e como

mecanismo de defesa da mesma (Ashe & Berry 2003, Baar *et al.* 2017), entretanto, a depender da capacidade do indivíduo, este consegue se recuperar por meio do processo de proliferação celular (Caccia *et al.* 2019).

O estresse oxidativo, ocasionado em decorrência do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO e ERN) e compostos antioxidantes, possui o potencial de iniciar este processo de morte celular (Maulik *et al.* 1998, Barbosa *et al.* 2010). ERO e ERN são radicais livres, que quando estão em equilíbrio, exercem funções importantes no sistema imunológico dos insetos. O óxido nítrico é um exemplo disso, no qual participa de processos de sinalização da presença de entomopatógenos e xenobióticos, e faz parte dos mecanismos de defesa humoral desses artrópodes (Bartling *et al.* 2021). A fenoloxidase também compõe esse tipo de defesa, esta enzima participa na formação da melanina, que está envolvida na esclerotização da cutícula, cicatrização, e no reconhecimento de agentes estranhos (Silva 2002, Negreiro *et al.* 2004).

Nesse contexto, nas últimas duas décadas as pesquisas acerca dos biopesticidas botânicos tiveram um grande aumento visto que eles apresentam diversas vantagens, sendo uma delas a maior seletividade a organismos não-alvo (Isman 2006, Isman 2020). Entretanto, apesar do alto número de estudos, pouca atenção foi dada ao efeito desses inseticidas naturais sobre a fisiologia dos insetos benéficos (Isman 2020). Isto se torna preocupante, em virtude de pesquisas terem revelado que os óleos essenciais e seus compostos isolados têm o potencial de comprometer a história de vida dos insetos, pragas e inimigos naturais, causando alterações histopatológicas (Almehmadi 2011, Oliveira *et al.* 2021), nutricionais (Cruz *et al.* 2017, Oliveira *et al.* 2021) e imunológicas (Silva *et al.* 2019).

Assim, testes fisiológicos são necessários para garantir a segurança dessas substâncias sobre as abelhas nos campos agrícolas, cujas operárias podem se contaminar, e por extensão toda a

colônia, durante o forrageamento (Potts *et al.* 2010) ou por meio de resíduos na água, no caso de pesticidas químicos sintéticos (Mullin *et al.* 2010, Ruiz-Toledo & Sánchez-Guillén 2014).

Perante o exposto, esta pesquisa teve por objetivo comparar as respostas imunológicas de abelhas *A. mellifera* expostas a xenobióticos sintéticos (inseticida piretróide-Karate® e herbicida glifosato-Roundup®) e naturais (biopesticida-Azamax® e composto Limoneno), amplamente utilizados na agricultura.

Material e Métodos

Obtenção dos Insetos. As abelhas *Apis mellifera* utilizadas nesta pesquisa foram cedidas pelo apiário experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram empregados recipientes plásticos com tampa perfurada na entrada das colmeias, nos quais possibilitaram as coletas de abelhas operárias. Em seguida, os insetos foram conduzidos aos Laboratório de Fisiologia de Insetos (LAFI) e Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados (LABEMOVI), ambos da UFRPE, onde foram utilizados nos bioensaios.

Obtenção das CL₅₀ Utilizadas nos Bioensaios. As CL₅₀ utilizadas para avaliação da imunohistoquímica e imunologia da população de abelhas *A. mellifera*, provenientes do apiário da UFRPE, foram obtidas através do estudo preliminar de Souza et al. (2023), que obtiveram para o inseticida Karate® a CL₅₀= 13.4 µL/100 mL de solução (solução de mel e água 1:1 + 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO)), o composto Limoneno CL₅₀= 1,440 µL/100 mL (mel+água+DMSO), e o herbicida Roundup® CL₅₀= 712,290 µL/100 mL (mel+água+DMSO). Para o inseticida botânico Azamax® foi utilizada a concentração de 250 µL/100 mL de solução (mel+água+DMSO), pois está foi a maior concentração deste produto que causou a morte sem

ocasionar repelência nos insetos (concentrações superiores repeliram 100% dos indivíduos amostrados, inviabilizando a obtenção da CL₅₀ para o Azamax[®]). O grupo controle foi tratado apenas com a solução de água e mel (1:1) + DMSO a 1%. A contaminação foi por ingestão, sendo disposto em um recipiente plástico um pedaço de algodão embebido com a solução de pesticida + mel + DMSO, em seguida, este recipiente foi tampado com tecido PVC para garantir que as abelhas se alimentassem sem entrar em contato direto com o mel contaminado. Os recipientes contendo as soluções dos produtos ficaram mantidos em gaiolas, constituídas por um tubo PVC (20 cm de altura X 15 cm de diâmetro) apoiado sobre um prato Vasart para vaso redondo e recoberto com tecido voil. Em cada gaiola foram colocadas 15 abelhas adultas, sendo 2 gaiolas/concentração, com o total de 30 abelhas/concentração. As gaiolas eram acomodadas em ambiente controlado de 25 ± 1 °C, 60 ± 10% UR. Após 24 horas de exposição aos tratamentos, as abelhas sobreviventes eram utilizadas nos ensaios seguintes.

Apoptose e proliferação. Para a análise imunohistoquímica (apoptose e proliferação celular), os intestinos médios foram incluídos em parafina e os cortes de 5 µm de espessura feitos em micrótomo Minot (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados em lâminas silanizadas. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica LAS Image (Junqueira & Junqueira 1983, Solomon 2009). Para detectar apoptose pela fragmentação do DNA, lâminas silanizadas contendo cortes de intestino médio, foram submetidas ao teste de TUNEL (Terminal Deoxinucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling) (Gravrieli *et al.* 1992) seguindo o protocolo do kit Apoptag Plus (Merck[®]). Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS (Tampão fosfato-salino) por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão de equilíbrio

por 60 minutos a 4° C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37° C por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (± 20 minutos), sendo contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz. Para determinar a proliferação celular, os cortes foram despafarfinizados, hidratados e submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato (pH=6) em banho-maria por 20 minutos, a 100 °C, e após descanso de 20 minutos em temperatura ambiente foi aplicado o peróxido de hidrogênio a 3 % por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão Tris (Tris-(hidroximetil)-aminometano) e com anticorpo PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (Spring) na diluição 1:100, por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em tampão Tris e incubados com histofine por 30 minutos, em seguida, submetidos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) e contracolorados com hematoxilina. O índice apoptótico e a proliferação celular foram determinados pelo percentual de células positivas a partir da contagem de, pelo menos, 500 núcleos/tratamento subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40x (Losa *et al.* 2000, Wu *et al.* 2013).

Preparação do macerado. Uma abelha adulta foi macerada em 500 μ L de tampão fosfato 0,1 mM pH 7,4 em um cadinho com auxílio de pistilo de porcelana. O macerado foi alocado em um tubo para centrífuga de 2 mL e centrifugado durante 1 min a 1000 rpm, para retirada de fragmentos de exoesqueleto dos insetos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 2 mL e mantidos refrigerados a -20 °C até a análise. Cada tratamento constou de 10 repetições no intervalo de 24 h após aplicação.

Dosagem de Óxido Nítrico. Foi utilizado o reagente de Griess (Green *et al.* 1981), avaliado pela concentração do íon nitrito (NO_2^-). Em um pool de 50 μL do macerado foi acrescido 70 μL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) (5%). Após incubação, em 50 μL da amostra (macerado/sulfanilamida) foi adicionado mais 50 μL de NEED (dihidroclorito de naftiletilenoamina) a 0,1 % em placa de microtitulação (Faraldo *et al.* 2005). A leitura da absorbância foi realizada a 562 nm na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo, Brasil) com o programa ADAP em modo endpoint. Os dados foram submetidos a ANOVA, e as médias comparada pelo teste de Tukey HSD, utilizando o software SAS Institute.

Atividade da Fenoxidase. Foi realizada a análise de cada tratamento com 10 μL do macerado, após 24 h de aplicação. Cada tratamento constou de dez repetições. Duplicatas de 50 μL desta mistura foram transferidas para a placa de microtitulação. Foi adicionado em cada poço 50 μL de L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a ativação da enzima. Absorbância foi feita na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo, Brasil) a 492 nm com o programa ADAP em modo fotometria cinética, onde atividade da enzima foi tomada durante a fase linear da reação em intervalos de 60 s durante 20 minutos, segundo Faraldo *et al.* (2006). Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, pelo SAS Institute.

Estresse oxidativo. Para o estresse oxidativo, foi avaliada a peroxidação lipídica realizada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Ohkawa *et al.* (1979). Dez insetos adultos de cada tratamento foram homogeneizados com KCl 1,15% + EDTA 3 mM em banho de gelo. Posteriormente, foi adicionado um meio de reação contendo 0,3% de ácido tiobarbitúrico, 0,4% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 7,5% de ácido acético (pH 3,5), e subsequentemente a mistura foi aquecida a 95 °C por uma hora. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante teve a absorbância mensurada em comprimento de onda de 535

nm. Os dados obtidos foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato, mensurada de acordo com Lowry et al. (1951). Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, pelo SAS Institute. Os níveis da glutatona (GSH) reduzida foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não proteicos, de acordo com metodologia de Sedlak & Lindsay (1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, 80 a 160 mg do tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 4mM, EDTA 4mM e DTNB 4mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

Resultados

Quanto à avaliação imunohistoquímica do intestino médio das abelhas, não foram observadas a presença de núcleos apoptóticos em relação à exposição aos xenobióticos sintéticos (Roundup[®] e Karate[®]) e naturais (Azamax[®] e composto Limoneno), após 24 h. No entanto, o tecido epitelial apresentou degeneração celular pela presença de vacúolos citoplasmáticos, sugerindo processo de necrose. Devido ao dano nas células, acredita-se que isso tenha sido um fator preponderante para que essas células não fossem capazes de secretar a matriz peritrófica, fazendo com que elas entrassem em contato com conteúdo do lúmen, e assim, com as enzimas digestivas (Figura 1). As células epiteliais não demonstraram a ativação dos mecanismos de regeneração por meio do processo de proliferação celular nas abelhas submetidas aos xenobióticos (Figura 2), sendo identificado PCNA positivo apenas no grupo controle (Figura 2A).

Após análise estatística, verificou-se que todos os produtos químicos utilizados, sendo eles o Karate[®] ($0,700 \pm 0,039 \mu\text{M}$ de NO_2), o Limoneno ($0,837 \pm 0,027 \mu\text{M}$ de NO_2), o Azamax[®] ($0,916 \pm$

0,047 μM de NO_2) e o Roundup[®] ($0,787 \pm 0,026 \mu\text{M}$ de NO_2), aumentaram o nível de óxido nítrico em abelhas, entretanto, o maior aumento foi observado no tratamento com o Azamax[®]. O Limoneno não se diferiu estatisticamente de ambos, Azamax[®] e Roundup[®]. Embora as abelhas que foram alimentadas com a solução de mel+Karate[®] tenham apresentado resposta semelhante ao controle ($0,591 \pm 0,025 \mu\text{M}$ de NO_2), o mesmo não foi diferente dos tratamentos com Roundup[®] e Limoneno, elevando o nível de NO_2 nas amostras (Figura 3).

Todos os xenobióticos avaliados causaram um aumento na atividade da enzima fenoloxidase após 24 h de exposição. As maiores alterações foram observadas nos tratamentos com o biopesticida Azamax[®] ($1,333 \pm 0,107 \text{ OD}/\text{min}/\text{mg}$), seguidas do composto Limoneno ($1,230 \pm 0,077 \text{ OD}/\text{min}/\text{mg}$) e o herbicida Roundup[®] ($1,225 \pm 0,044 \text{ OD}/\text{min}/\text{mg}$), que não se diferiram entre si. Novamente, o inseticida Karate[®] ($1,003 \pm 0,053 \text{ OD}/\text{min}/\text{mg}$) não foi diferente estatisticamente do grupo controle ($0,987 \pm 0,019 \text{ OD}/\text{min}/\text{mg}$) (Figura 4).

Todos os agentes químicos testados, com exceção do Limoneno, demonstraram causar um aumento do estresse oxidativo mensurado pelo TBARS, indicando a peroxidação lipídica celular nas amostras de abelhas avaliadas. O herbicida Roundup[®] ($1,838 \pm 0,205 \text{ nmol de MDA}/\text{mg}/\text{proteína}$) se destacou, sendo o produto que mais gerou estresse oxidativo nas células, seguido pelo Azamax[®] ($1,280 \pm 0,070 \text{ nmol de MDA}/\text{mg}/\text{proteína}$) e Karate[®] ($1,214 \pm 0,055 \text{ nmol de MDA}/\text{mg}/\text{proteína}$). O composto Limoneno ($0,914 \pm 0,096 \text{ nmol de MDA}/\text{mg}/\text{proteína}$) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($0,782 \pm 0,109 \text{ nmol de MDA}/\text{mg}/\text{proteína}$), logo, essa substância não chegou a promover esse tipo de estresse após 24h de exposição (Figura 5). Dentro deste mesmo período de avaliação, não houve diferenças nos níveis da mensuração da Glutathione-S-Transferase (GSH) (Figura 6).

Discussão

As alterações histopatológicas e imunológicas observadas nas abelhas tratadas sugerem que, as substâncias testadas foram altamente nocivas a esses organismos, e não lhe deram tempo para ativação dos mecanismos de regeneração (Illa-Bochaca & Montuenga 2006, Caccia *et al.* 2019). Levando em consideração que, em geral, os produtos naturais são considerados seletivos, essa é uma descoberta importante, pois esses compostos naturais são analisados principalmente pelo ponto de vista de sua toxicidade aguda sobre os insetos benéficos (Sabahi *et al.* 2022), mas são poucas as informações sobre como esses compostos afetam as abelhas a nível celular, com implicações severas a sua fisiologia e saúde.

Trabalhos que testaram os efeitos de doses subletais de defensivos agrícolas sintéticos, indicaram a ocorrência do processo apoptótico em resposta ao agente químico estressor. Qi *et al.* (2020), constataram que a exposição crônica a concentração de 1,0 mg/L de flumetrina, um piretroide utilizado para o controle do ácaro parasita de abelhas, *Varroa destructor* (Anderson e Treuman), causou apoptose no intestino médio de operárias recém-emergidas, da espécie *A. mellifera*. E Gregorc & Ellis (2011) demonstraram que houve apoptose no intestino médio de larvas contaminadas com 400 ppm de glifosato. Em contraste, a necrose do tecido epitelial observada nesta pesquisa pode ser explicada pela utilização de concentrações letais nos ensaios, somado a maior susceptibilidade das abelhas a xenobióticos, que possuem baixo potencial de desintoxicação enzimática quando comparado a outros insetos (Claudianos *et al.* 2006).

Diferente das outras substâncias, o Limoneno não possui a molécula de oxigênio em sua composição, que é capaz de desencadear radicais livres deletérios ao organismo, deixando o indivíduo susceptível ao estresse oxidativo (Kumar *et al.* 2022). Além disso, já existe relato que os monoterpenos podem conter propriedades antioxidantes (Yu *et al.* 2017). Assim, não é surpreendente que este composto não tenha causado estresse oxidativo nas abelhas.

O modo de ação do Limoneno está associado à inibição neuromuscular da acetilcolinesterase (AChE), levando ao acúmulo de AChE, no qual gera excitação neuronal, e morte dos insetos (García *et al.* 2005, Zarrad *et al.* 2017, Gadelhaq *et al.* 2023). Além disso, em *A. mellifera* foram mostrados os efeitos sobre as células intestinais, desenvolvendo implicações decorrentes das lesões necróticas observadas no epitélio.

O estresse oxidativo observado nos demais tratamentos, indica a ocorrência da peroxidação lipídica em abelhas, e como consequência, ocorre a alteração de funções básicas da membrana celular (Barbosa *et al.* 2010). Estudos relacionam o processo apoptótico a umas das respostas da célula a este estresse (Li & Wogan 2005, Kim & Lee 2020), entretanto, ele também pode ser a causa do desencadeamento da necrose epitelial nesta população de *A. mellifera*, sendo este efeito mais expressivo em amostras tratadas com o glifosato.

De fato, estudos com este herbicida mostram que ele afeta a sobrevivência e saúde de diferentes espécies de larvas e adultos de abelhas, expostas de forma aguda ou crônica, levando a modificações a nível molecular, celular, histológico e de sistemas biológicos (Battisti *et al.* 2023). Um aspecto relevante relatado por Liao *et al.* (2017), é que uma solução de água+açúcar+glifosato (10 ppb) foi mais atrativa para as abelhas quando comparado a solução sem o herbicida, isso se torna um alarme para a possível contaminação desses organismos por meio de néctar no ambiente natural.

O intestino médio constitui uma das primeiras barreiras de defesa dos insetos contra organismos patogênicos e xenobióticos (Schmid-Hempel 2005). Devido ao comprometimento desta função, os dados confirmam por meio da ativação da cascata fenoloxidase e alteração nos níveis de NO₂, o envolvimento de mecanismos de defesas humoral da célula de abelhas expostas aos pesticidas sintéticos e naturais.

A baixa atividade da enzima fenoloxidase e o nível reduzido de NO₂ nos ensaios com o Karate[®], também foi observada por Silva *et al.* (2019) em percevejos da espécie *Podisus nigrispinus* (Dallas), submetidos a outro piretróide, o deltametrina, ambos sob o tempo de avaliação de 24 h. Entretanto, após 72 h de exposição, esses autores verificaram um aumento da atividade da fenoloxidase, em simultâneo a alta nos níveis de proteínas totais em *P. nigrispinus*. Ainda assim, as análises de apoptose e proliferação, no caso da população de abelhas amostradas nesta pesquisa, evidenciaram a necrose da célula. Desta forma, o inseticida Karate[®] e os outros compostos aqui estudados causam danos irreversíveis, pois estes não podem ser acompanhados pela reparação celular, conseqüentemente, levando a morte do organismo (Miller & Zachary 2017).

Estudos anteriores também demonstraram a repelência da azadiractina, ingrediente ativo do Azamax[®], para outra espécie de abelha (Barbosa *et al.* 2015) e outros insetos (Ikeura *et al.* 2013, Andrade *et al.* 2013). Em relação a *A. mellifera*, foi constatado o efeito repelente do Azamax[®] sob concentrações acima de 250 µL/100 mL, assim, existe a possibilidade deste inseticida ser utilizado nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) de forma a preservar a abundâncias desses polinizadores no agroecossistema. Isto porque o modo de ação da azadiractina está associado ao aumento da contaminação por ingestão (Martinez & Van Emden 2001), e em campo a probabilidade de contato com esta substância diminui. Entretanto, devido à forte ação deletéria do Azamax[®] sobre o sistema digestivo e imunológico das abelhas, é imprescindível estar atento para que a sua pulverização não coincida com o horário de forrageamento das abelhas *Apis*.

Portanto, a exposição dessa população de *A. mellifera* ao inseticida natural Azamax[®] e ao Limoneno, acarretou em respostas análogas aos pesticidas sintéticos Karate[®] e Roundup[®]. Assim, mesmo que os produtos naturais sejam, em geral, considerados seletivos a organismos não alvos, é necessário entender como esses compostos interferem na fisiologia das abelhas, para, desta forma,

garantir que os inseticidas botânicos utilizados na agricultura sejam realmente seguros para esses polinizadores.

Literatura Citada

- 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.
- 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.
- Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neurop. Biol. Psych.* 27: 199-214.
- Barbosa, K.B.F., N.M.B. Costa, R.C.G. Alfenas, S.O. Paula, V.P.R. Minim & J. Bressan. 2010.** Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.* 23: 629-643.
- Barbosa, W.F., L. De Meyer, R.N.C. Guedes & G. Smaghe. 2015.** Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicol.* 24: 130–142.
- Battisti L., M. Potrich, R.E. Lozano, C.B.R. Martinez & S.H. Sofia. 2023.** Review on the sublethal effects of pure and formulated glyphosate on bees: Emphasis on social bees. *J. Appl. Entomol.* 147: 1–18.
- Bartling, M.T., S. Thümecke, J.H. Russert & A. Vilcinskas. 2021.** Exposure to low doses of pesticides induces an immune response and the production of nitric oxide in honeybees. *Sci Rep.* 11: 6819.
- Caccia, S., M. Casartelli & G. Tettamanti. 2019.** The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Res.* 377:505–525.
- Claudianos, C., H. Ranson, R.M. Johnson, S. Biswas, M.A. Schuler, M.R. Berenbaum, R. Feyereisen & J.G. 2006.** Oakeshott. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15: 615–636.
- Cruz, G.S., V.W. 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.

- Decourtye, A., J. Devillers, E. Genecque, M. K. Le, H. Budzinski, S. Cluzeau & P.M.H. Delègue. 2005.** Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 242-250.
- 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.
- Gadelhaq, S.M., S.M. Aboelhadid, A.A.S. Abdel-Baki, K.M. Hassan, W.M. Arafa, S.M. Ibrahim, S. Al-Quraishy, A.O. Hassan & S.G.A. El-Kareem. 2023.** D-limonene nanoemulsion: lousicidal activity, stability, and effect on the cuticle of *Columbicola columbae*. *Med. Vet. Entomol.* 37: 63–75.
- García, M., O.J. Donadel, C.E. Ardanaz, C.E. Tonn & M.E. Sosa. 2005.** Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Manag. Sci.* 61: 612–618.
- Giannini, T.C., G.D. Cordeiro, B.M. Freitas, A.M. Saraiva & V.L.I. Fonseca. 2015.** The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108: 849–857.
- Gill, R.J. & N.E. Raine. 2014.** Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Funct. Ecol.* 28:1459-1471.
- Green, L.C., K.R. Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. Department of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139 Communicated by Gerald N. Wogan.
- Goulson, D., E. Nicholls, C. Botías & E.L. Rotheray. 2015.** Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science.* 347: 1255957.
- 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.
- Graystock, P.K., S.E.F. Yates, B. Evison, D. Darvill, W. Goulson & O.H. Hughes. 2013.** The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *J. Appl. Ecol.* 50:1207-1215.
- Herbert, L.T., D.E. Vazquez, A. Arenas & W.M. Farina. 2014.** Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217: 3457-3464.

- Ikeura, H., A. Sakura & M. Tamak. 2013.** Repellent effect of neem against the cabbage armyworm on leafvegetables. *J. Agric. Sustain.* 4: 1-15.
- Illa-Bochaca, I. & L.M. Montuenga. 2006.** The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J. Exp. Biol.* 209: 2215-2223.
- Isman, M. B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45–66.
- Isman, M.B. 2020.** Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise? *Annu. Rev. Entomol.* 65: 233–249.
- Kim, H. & D.G. Lee. 2020.** "Nitric oxide-inducing Genistein elicits apoptosis-like death via an intense SOS response in *Escherichia coli*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104: 10711.
- Klein, A.M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen & T. Tscharntke. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Royal Soc. B Biol. Sci.* 274: 303-313.
- Kumar, D., D. Banerjee, P. Chakrabarti, S. Sarkar & P. Basu. 2022.** Oxidative stress and apoptosis in Asian honey bees (*A. cerana*) exposed to multiple pesticides in intensive agricultural landscape. *Apidologie* 53: 25.
- Li, C.Q., G.N. Wogan. 2005.** Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226: 1-15.
- Liao, L.H., W.Y. Wu & M.R. Berenbaum. 2017.** Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Sci. Rep.* 7: 1–8.
- Losa, M., R.L. Barzagli, P. Mortini, A. Franzin, F. Mangili, M.R. Terreni & M. Giovanelli. 2000.** Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors: comparison between micro- and macroadenomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 156: 245–251.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Martinez, S. & E.H.F. Van. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113–125.
- Maulik, N., T. Yoshida & D.K. Das. 1998.** Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 869-875.
- Miller, M.A. & J.F. Zaachary. 2017.** Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death, p. 2-43 In J.F. Zachary & M.D. McGavin (60 eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier. 1249p.

- Michener, C. 2007.** The bees of the world. Johns Hopkins University Press.
- 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.
- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. Cienc. Agr. 25: 293-308.
- Oliveira, F.M., V.W. 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.C.T. Álvaro. 2021.** Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L. larvae (Diptera: Culicidae). Acta Trop. 221: 105987.
- Ohkawa, H., N. Ohishi & K. Yagi. 1979.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358.
- 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.
- Qi, S., X. Niu, D. hui Wang, C. Wang, L. Zhu, X. Xue, Z. Zhang & L. Wu. 2020.** Flumethrin at sublethal concentrations induces stresses in adult honey bees (*Apis mellifera* L.). Sci. Total Environ. 700: 134500.
- 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.
- Sabahi, Q., P.G. Kelly & E. Guzman-Novoa. 2022.** Carvone and citral, two promising compounds for controlling the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. J. Appl. Entomol. 146: 1003–1010.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50: 529 – 551.
- Sedlak, J. & R.H. Lindsay. 1968.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 25: 192–205.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. Biotecnol. Cienc. Desenv. 24: 68-72.
- Silva, C.T.S., V.W. Teixeira, G.S. Cruz, F.M. Cunha & A.A.C. Teixeira. 2019.** Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. Austral Entomol. 59: 215-224.

- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. *Americ. J. Roentgenology*. 192: 330-334.
- Souza, C.O., V.W. Teixeira, G.S. Cruz, C.A. Guedes, J.C.S. Nascimento, C.J.C. Lapa Neto & A.A.C. Teixeira. 2023.** Toxicology, histophysiological and nutritional changes in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) submitted to limonene and natural pesticides in comparison to synthetic pesticides. *J. Apic. Res.* DOI: 10.1080/00218839.2023.2166229
- Wu, X., B. Cheng, Z.D. Cai & L.M. Lou. 2013.** Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Cancer Cell Int.* 13:1-4.
- Yu, L., J. Yan & Z. Sun. 2017.** D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* 15: 2339 – 2346.
- Zarrad, K., A. Laarif, A.B. Hamouda, I. Chaieb & J.M.-B. Jemâa. 2017.** Anticholinesterase potential of monoterpenoids on the whitefly *Bemisia tabaci* and their kinetic studies. *J. Agr. Sci. Tech.* 19: 643–652.
- Zattara, E.E. & M.A. Aizen. 2021.** Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth.* 4: 114–23.

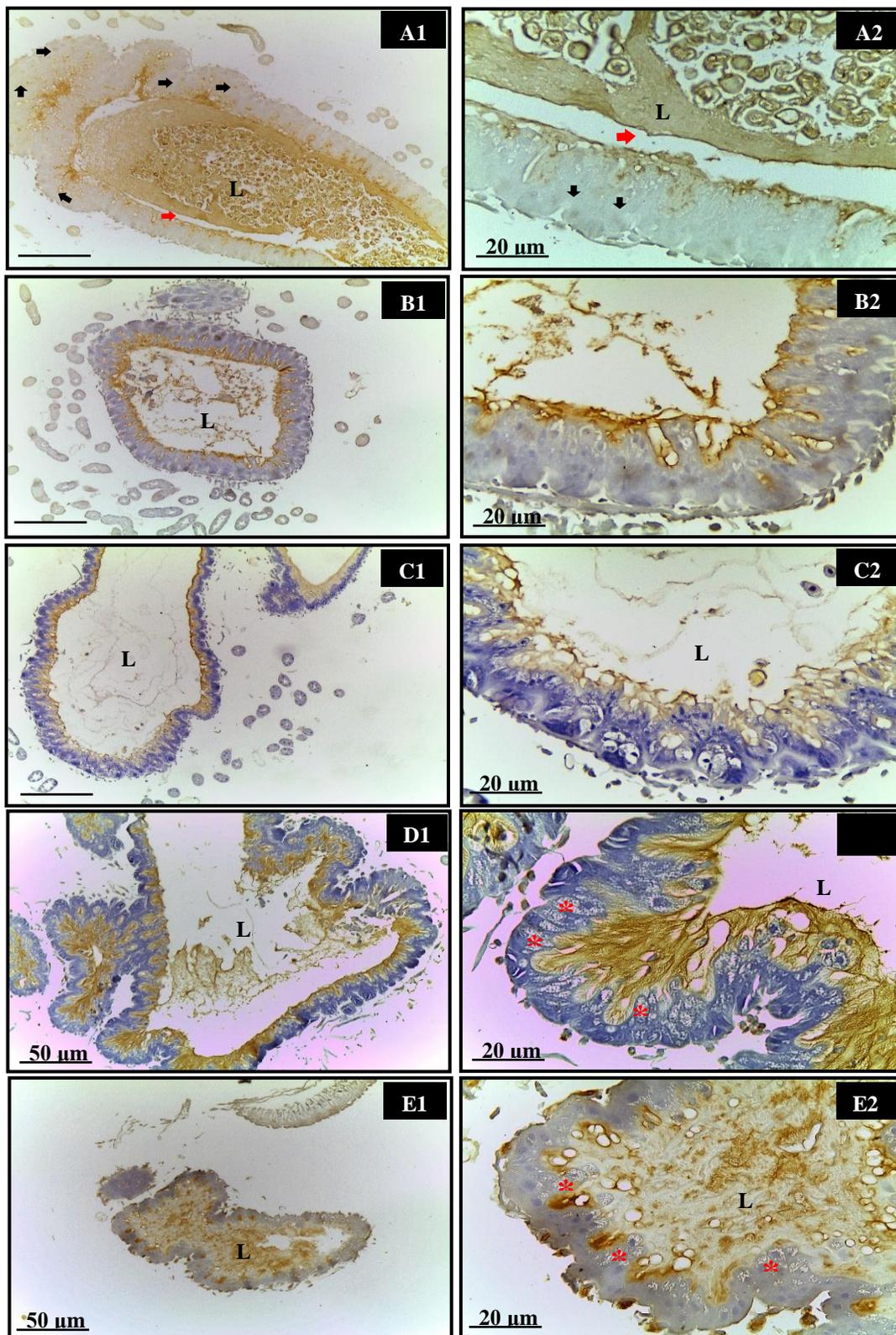


Figura 1. Avaliação de apoptose do intestino médio de adultos de *Apis mellifera*, pelo teste de Tunel. Nos quais, A1 e A2- Controle, B1 e B2- Azamax[®], C1 e C2- Limoneno, D1 e D2- Roundup[®], E1 e E2- Karate[®], L- Lúmen, Seta preta- núcleos apoptóticos, Seta vermelha- matriz peritrófica, Asterisco- Células vacuolizadas.

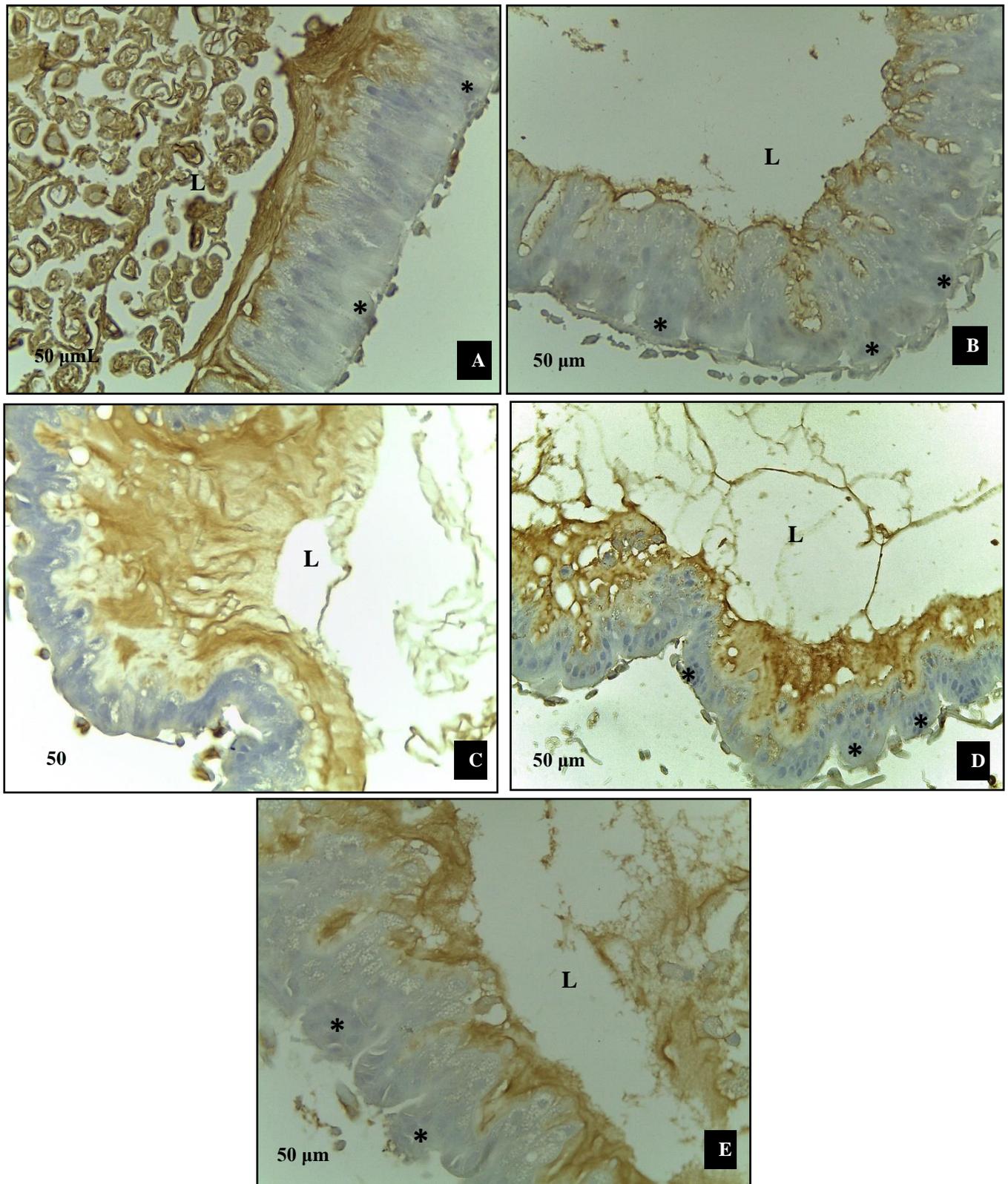


Figura 2. Análise da proliferação celular (PCNA). Corte transversal do intestino médio de abelhas adultas, *Apis mellifera*. A- Controle, B- Azamax[®], C- Limoneno, D- Roundup[®], E- Karate[®], L- Lúmen, asterisco- células regenerativas.

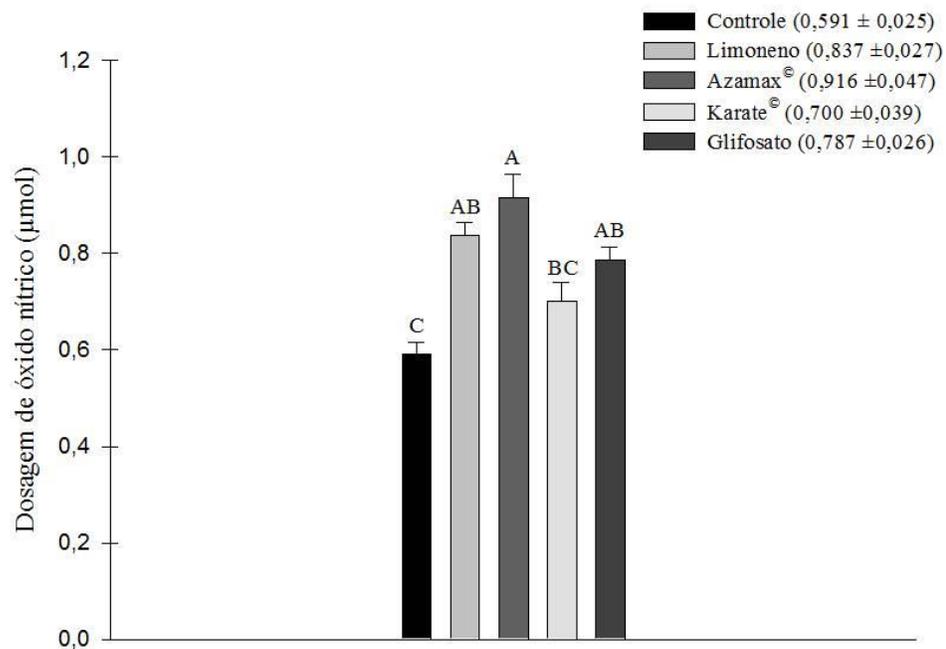


Figura 3. Média (+EP) da dosagem do nível de óxido nítrico (μM de NO_2) em abelhas *Apis mellifera* submetidas a CL_{50} do composto Limoneno, dos inseticidas Azamax[®], Karate[®] e do herbicida Glifosato. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

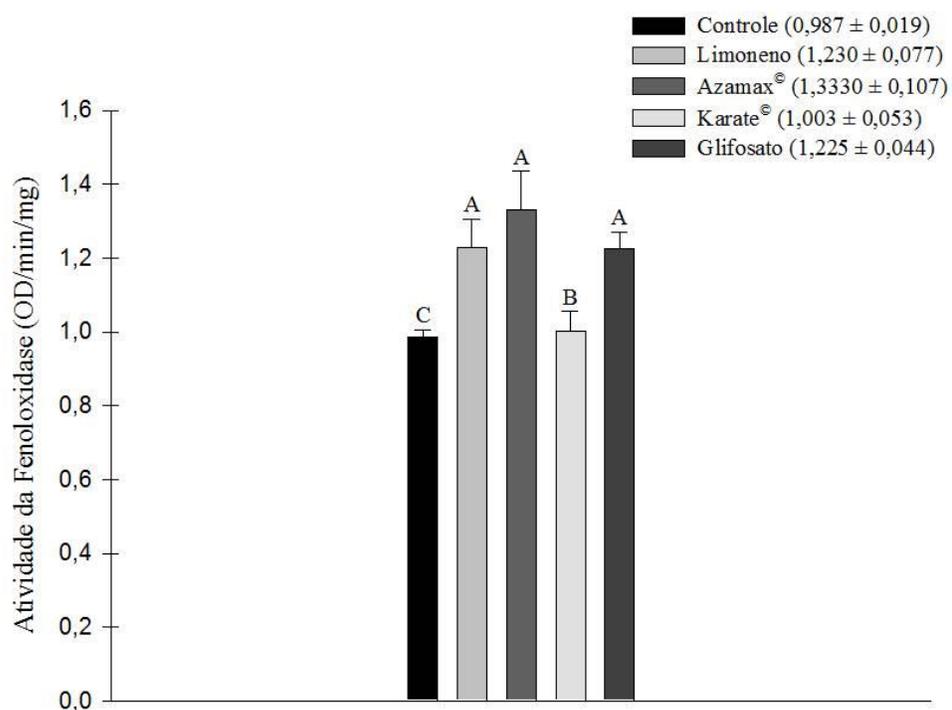


Figura 4. Atividade da enzima fenoloxidase (OD/min/mg) em abelhas *Apis mellifera* submetidas a CL₅₀ do composto Limoneno, dos inseticidas Azamax®, Karate® e do herbicida Glifosato. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

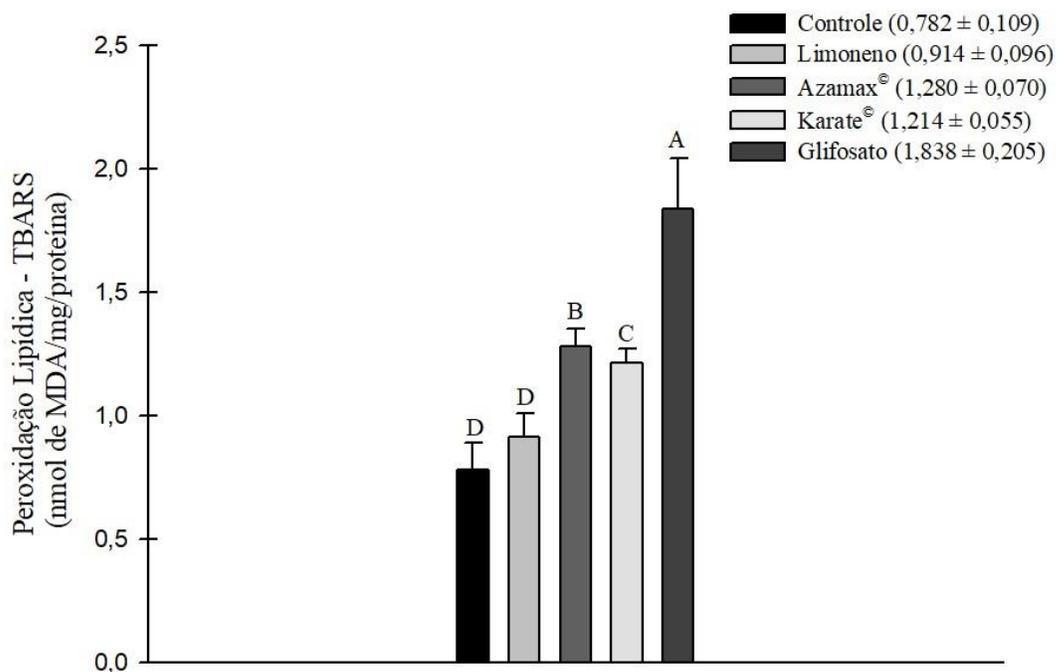


Figura 5. Estresse oxidativo a partir da mensuração do ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicativo de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg/proteína) em abelhas *Apis mellifera* submetidas a CL₅₀ do composto Limoneno, dos inseticidas Azamax®, Karate® e do herbicida Glifosato. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

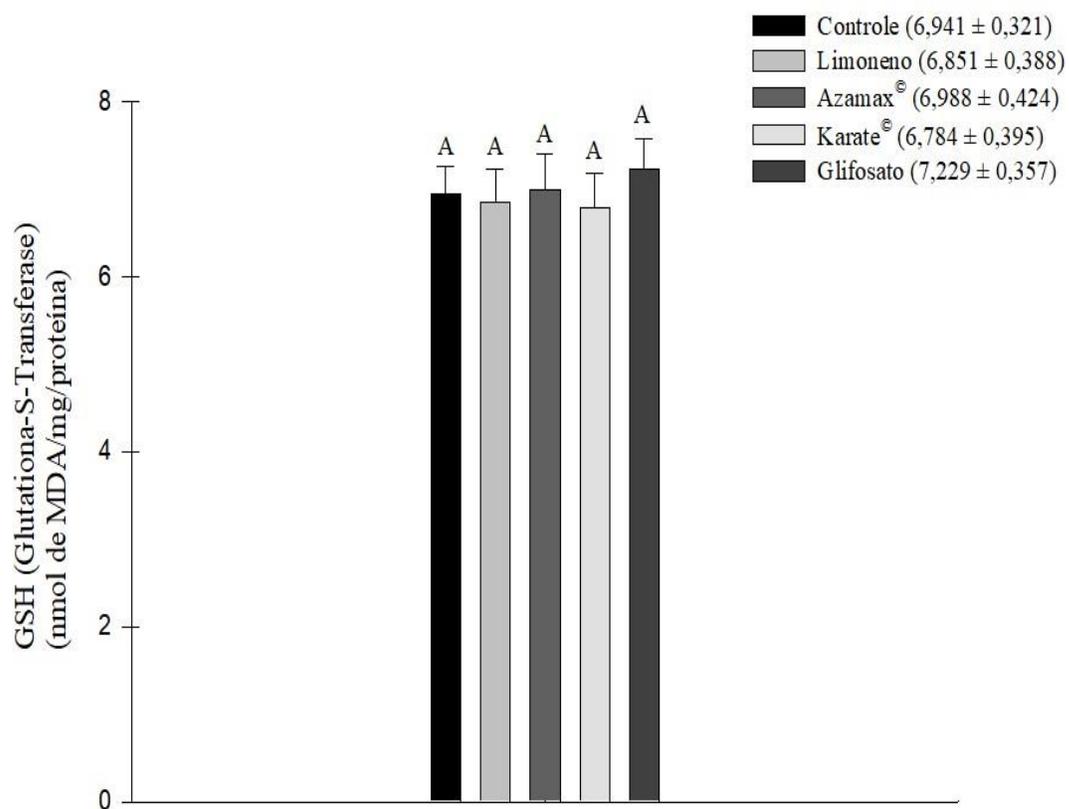


Figura 6. Estresse oxidativo a partir da mensuração da Glutaciona-S-Transferase (GSH) em abelhas *Apis mellifera* submetidas a CL₅₀ do composto Limoneno, dos inseticidas Azamax[®], Karate[®] e do herbicida Glifosato. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao analisar os resultados desta pesquisa, há uma comprovação de que todos os xenobióticos testados, sintético ou natural, causaram danos celulares irreversíveis, levando ao comprometimento da fisiologia do sistema digestivo das abelhas, conseqüentemente, afetando sua imunologia e capacidade de regenerar o epitélio.

O tecido epitelial sofreu alterações nas células, sendo observado a presença de vacúolos citoplasmáticos e extravasamento do conteúdo celular, sinalizando necrose. Devido ao dano na célula, a matriz peritrófica se tornou ausente, assim, o epitélio ficou em contato com o material encontrado no lúmen, que contém enzimas digestivas prejudiciais ao tecido. O estresse oxidativo constatado nas amostras expostas ao herbicida glifosato (Roundup[®]), inseticida lambda-cialotrina (Karate[®]) e bioinseticida azadiractina (Azamax[®]) pode ter contribuído para este efeito necrótico no intestino médio das abelhas.

Apesar do composto Limoneno não ter causado estresse oxidativo, ele também foi capaz de ocasionar necrose celular, e como as outras substâncias estudadas, prejudicou o sistema imunológico das abelhas, modificando a atividade da enzima fenoloxidase e os níveis de óxido nítrico.

Por fim, de forma geral esta pesquisa chama a atenção da ação nociva dos produtos naturais sobre as células epiteliais e sistema imune das abelhas, que se equiparam aos efeitos dos pesticidas sintéticos estudados. Isto deixa clara a necessidade de estudos voltados à identificação dos mecanismos pelos quais os defensivos utilizados na agricultura agem sobre a fisiologia dos organismos não-alvo, seja esse pesticida sintético ou natural. Assim, a partir dos dados obtidos

nesta pesquisa, os agricultores terão informações importantes a considerar no delineamento adequado do manejo de uma praga, com a finalidade de preservar os polinizadores na área.