

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 20/10/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE DOSE SUBLETAL DE FIPRONIL E
PIRACLOSTROBINA, ISOLADAS OU ASSOCIAÇÃO, NA
MORFOLOGIA DE GLÂNDULAS E PROTEOMA DA CABEÇA DE
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

RODRIGO ZALUSKI

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP

Outubro – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE DOSE SUBLETAL DE FIPRONIL E
PIRACLOSTROBINA, ISOLADAS OU ASSOCIAÇÃO, NA
MORFOLOGIA DE GLÂNDULAS E PROTEOMA DA CABEÇA DE
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

RODRIGO ZALUSKI

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor.

BOTUCATU – SP

Outubro – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
- SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Zaluski, Rodrigo, 1989-
Z22e Efeito de dose subletal de fipronil e piraclostrobina, isoladas ou associação, na morfologia de glândulas e proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* L. / Rodrigo Zaluski. - Botucatu : [s.n.], 2017
155 f.: ils. color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2017
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha
Inclui bibliografia

1. *Apis mellifera*. 2. Inseticidas. 3. Fungicidas. 4. Morfologia (Animais). 5. Proteômica. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Padilha, Pedro de Magalhães. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

DEDICO

Aos meus pais, Sérgio Renato Zaluski e Júlia Zaluski, por me ensinarem a valorizar cada oportunidade e me darem força e incentivo para lutar e alcançar meus objetivos.

Aos meus avós, Natália Danelichen Zaluski e Gregório Zaluski (*in memoriam*) pelas lições e por sua história de vida e ao meu irmão Rafael Zaluski pelo apoio e incentivo em cada momento.

Ao grande amigo e professor, Ernesto Dietrich Hartmut Breyer, que sempre me incentivou e foi responsável por me fazer descobrir o "fantástico mundo das abelhas".

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde e força, por colocar as pessoas certas em meu caminho e que me auxiliaram a conquistar este título.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, grande amigo e orientador na vida pessoal e profissional. Agradeço imensamente pela confiança depositada e pela oportunidade para realização desta tese. Muito obrigado pela dedicação, sugestões, ensinamentos, compreensão, por me ajudar crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha pela co-orientação, pelos ensinamentos, oportunidades, disponibilidades de equipamentos e conhecimentos na área da proteômica.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Jr. pela oportunidade de trabalhar na área de morfologia, disponibilidade de equipamentos, ensinamentos e aconselhamentos.

Aos colegas Dr. José Cavalcante Souza Vieira, Dra. Alis Correia Bitarello e Dra. Camila Braga pelo auxílio nos estudos proteômicos, sugestões, ensinamentos e dedicação a esta pesquisa.

Ao laboratório de Espectrometria de Massas - Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, especialmente a M.Sc. Aline de Lima Leite pelo auxílio na identificação de proteínas.

Aos colegas Dra. Thaís de Sousa Bovi e M.Sc. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos pelo auxílio nos estudos morfológicos, incentivo e amizade.

Aos amigos de Pós-graduação do grupo NECTAR, Samir Moura Kadri, Adriana Fava Negrão, Cinthia Rio Branco da Silva, Alex Shinohara, Juliana Sartori Lunardi, Wellington Luiz de Paula Araújo e aos demais integrantes do grupo pelo companheirismo e amizade ao longo desta etapa.

Ao funcionário do Setor de Apicultura, Maurício Silva, pela amizade e auxílios prestados no decorrer da execução do presente trabalho.

Aos professores dos Departamentos de Produção Animal e de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ - UNESP, Câmpus Botucatu, pela dedicação e ensinamentos durante a Pós-graduação.

Às secretárias da seção de Pós-graduação em Zootecnia pela atenção e orientações nas questões burocráticas.

Aos secretários do Departamento de Produção Animal pela atenção e amizade.

À empresa Breyer & Cia. Ltda. pelo fornecimento dos produtos apícolas orgânicos necessários para realização do presente estudo.

Ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), especialmente ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela dedicação e comprometimento na realização das análises de resíduos de agrotóxicos.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Matriz Extracelular - Departamento de Morfologia e do Laboratório Química Analítica e Eletroforese - Departamento de Química pelo auxílio prestado.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ - UNESP, Câmpus de Botucatu, pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu, por todo o suporte oferecido para a obtenção do título de Doutor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo: 165696/2014-1) pela bolsa de estudos concedida.

Deixo aqui meu muito obrigado a todos que fizeram parte desta caminhada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

RODRIGO ZALUSKI

Data de nascimento: 04 de Novembro de 1989

Naturalidade: Mallet – PR

E-mail: rodrigozaluski@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014–2017: Doutorado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Brasil.

2012–2014: Mestrado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Brasil.

2008–2012: Graduação em Ciências Biológicas; Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de União da Vitória – PR, Brasil.

DISTINÇÕES ACADÊMICAS

2015: Menção Honrosa - XV Workshop de Genética, com a apresentação do trabalho “Defensin I gene expression in *Apis mellifera* exposed to sublethal dose of insecticide fipronil”. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

2015: Menção Honrosa - Cerimônia Comemorativa do Jubileu de Prata do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, com a apresentação do trabalho “Desenvolvimento, morfologia e proteoma de glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* L. expostas à dose subletal de fipronil e piraclostrobina”. FMVZ – UNESP, Botucatu.

2015: Prêmio - Trabalho de Extensão Universitária: “Captura de enxames de abelhas africanizadas em área urbana no município de Botucatu, São Paulo, Brasil”. Pró-reitora de Extensão Universitária, FMVZ – UNESP, Botucatu.

2013: Prêmio - XIV Workshop da Pós-Graduação, com a apresentação oral do trabalho “Toxicidade do inseticida fipronil para abelhas *Apis mellifera* Africanizadas”. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

2012: Prêmio - Melhor aluno do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade Estadual de Filosofia Ciências e Letras de União da Vitória - Paraná, no período de 2008 a 2011. Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de União da Vitória – PR.

2012: Menção Honrosa - 11º Encontro de Iniciação Científica e Mostra de Pós-Graduação, com a apresentação do trabalho “Retirada de enxames nidificados e transitórios de abelhas africanizadas nas áreas urbanas das cidades de União da Vitória - PR e Porto União - SC, visando a produção apícola orgânica e utilizando metodologia inovadora”. Faculdade Estadual de Filosofia Ciências e Letras de União da Vitória – PR.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados

1. LUNARDI, J. S.; **ZALUSKI, R.**; ORSI, R. O. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 64, p. 50-56 2017.
2. KADRI, S. M.; **ZALUSKI, R.**; ORSI, R. O. Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. **Food Chemistry**, v. 218, p. 237-241, 2017.
3. SOUZA, E. A.; **ZALUSKI, R.**; VEIGA, N.; ORSI, R.O. Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus beehives. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 396-401, 2016.
4. KADRI, S. M.; **ZALUSKI, R.**; LIMA, G. P. P.; MAZZAFERA, P.; ORSI, R. O. Characterization of *Coffea arabica* monofloral honey from Espírito Santo, Brazil. **Food Chemistry**, v. 203, p. 252-257, 2016.

5. ONARI, P.; ZALUSKI, R.; BOVI, T. S. ; ORSI, R. O. Apitoxin harvest affects population development but not the hygienic behavior of African-derived honey bees. **Sociobiology**, v. 63, p. 688-692, 2016.

6. ZALUSKI, R.; KADRI, S. M.; ALONSO, D. P.; RIBOLLA, P. E. M.; ORSI, R. O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, p. 1062-1069, 2015.

7. ZALUSKI, R.; KADRI, S. M.; SOUZA, E. A.; ORSI, P. R.; ORSI, R. O. Africanized honeybees in urban areas: A public health concern. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 659-662, 2014.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Número total de citações Scopus: 17; Fator H: 2.

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0549496954047545>

URL: <http://www.researcherid.com/rid/H-5935-2016>

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8256-826X>

RESUMO

EFEITO DE DOSE SUBLETAL DE FIPRONIL E PIRACLOSTROBINA, ISOLADAS OU ASSOCIAÇÃO, NA MORFOLOGIA DE GLÂNDULAS E PROTEOMA DA CABEÇA DE ABELHAS *Apis mellifera* L.

As abelhas melíferas são importantes agentes polinizadores em cultivos agrícolas e áreas de vegetação nativa e diretamente responsáveis pela produção apícola. Entretanto, grandes perdas de colônias manejadas vêm sendo registradas mundialmente, sendo a ampliação do uso de agrotóxicos uma das principais causas que pode estar associada a esse fenômeno. No presente trabalho, observou-se por meio de análises morfológicas, que a exposição de abelhas nutrizas em colônias, durante seis dias, a pastas de pólen contaminadas com doses ambientalmente relevantes do inseticida sistêmico fipronil (2,5 ppb) e fungicida piraclostrobina (850 ppb), isolados ou em associação, promoveu redução na altura das células secretoras das glândulas mandibulares; e que a associação dos agrotóxicos também reduziu o reservatório dessas glândulas. Nas glândulas hipofaríngeas, o número de ácinos que compõem a glândula não foi alterado, porém, a exposição aos agrotóxicos ocasionou redução na área dessas estruturas. Em conjunto, essas alterações podem reduzir a capacidade de secreção de geleia real pelas abelhas nutrizas. Estudos do proteoma da cabeça das abelhas utilizando a técnica 2D-PAGE para o fracionamento de proteínas, com identificação das proteínas em *spots* que apresentaram diferença de expressão (comparando grupos expostas e não-expostas aos agrotóxicos) por ESI-MS/MS, demonstraram alterações na expressão de proteínas pertencentes a família das principais proteínas geleia real (MRJPs); e de proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos e síntese de energia, sistema antioxidante, detoxicação, processos de biossíntese, metabolismo de aminoácidos, transcrição e tradução, enovelamento e ligação a proteínas, sistema olfatório, aprendizagem e memória. Análises de resíduos nas pastas de pólen fornecidas às colônias realizadas por UHPLC-MS/MS confirmaram a presença de 870 ± 53 ppb piraclostrobina; entretanto, o inseticida fipronil e seus principais metabólitos não foram detectados dentro de limite de detecção utilizado (1,5 ppb). Conclui-se que a exposição de abelhas nutrizas a doses ambientalmente relevantes de piraclostrobina, fipronil ou a suas associações prejudica

as glândulas mandibulares e hipofaríngeas e ocasiona alterações na expressão de proteínas que podem prejudicar a manutenção de suas colônias. Destaca-se a importância de avaliar a quantidade de resíduos de agrotóxicos presentes em recursos coletados pelas abelhas em função das doses autorizadas para sua aplicação e os potenciais impactos que esses resíduos acarretam para manutenção de suas colônias. A redução do uso de agrotóxicos nos ecossistemas e a diminuição da exposição das abelhas a essas moléculas evitando sua aplicação durante a floração de cultivos, adotando estratégias como o Manejo Integrado de Pragas e de controle biológico e estabelecendo testes mais rigorosos para liberação/reavaliação de agrotóxicos são estratégias fundamentais para manutenção de colônias de abelhas manejadas e para redução de danos ocasionados por agrotóxicos a outras espécies não-alvo.

ABSTRACT

EFFECTS OF SUBLETHAL DOSE OF FIPRONIL AND PYRACLOSTROBIN ISOLATED OR IN ASSOCIATION ON THE MORPHOLOGY OF GLANDS AND PROTEOME OF *Apis mellifera* L. HONEYBEES HEAD

Honey bees are important pollinators of crops, native vegetation, and producers of honey and other goods. However, large losses of managed colonies have been recorded worldwide, and the increase in the use of pesticides is one of main causes that may be associated with this phenomenon. In the present work, it was observed by morphological analyzes that the exposure of nurse bees in colonies, during six days, to pollen patties contaminated with environmentally relevant doses of the systemic insecticide fipronil (2.5 ppb) and fungicide pyraclostrobin (850 ppb), isolated or in association, promoted a reduction in the height of the secretory cells of the mandibular glands; when pesticides were combined, the reservoir volume in mandibular glands also decreased. Although the total number of acini of hypopharyngeal glands was not affected, pesticide exposure reduced acini area. These alterations might reduce the capacity of royal jelly secretion by nurse honeybees. Proteomic studies of honeybees heads using 2D-PAGE to protein fractionation and their identification in spots that showed differences of expression (comparing groups exposed and non-exposed to pesticides) by ESI-MS/MS demonstrated alterations in expression of Major Royal Jelly Proteins (MRJPs); and of proteins involved in carbohydrate metabolism and energy production, antioxidant system, detoxification, biosynthetic process, amino acid metabolism, transcription and translation, protein folding and binding, olfactory system, learning and memory. Residue analyses of pesticides in contaminated pollen patties supplied to colonies were performed by UHPLC-MS/MS and confirmed presence of 870 ± 53 ppb of pyraclostrobin; however, no fipronil or metabolites were detected within of limit of detection (1.5 ppb). It is concluded that exposure of nurse honeybees to field-relevant doses of pyraclostrobin, fipronil and their association impairs mandibular and hypopharyngeal glands and causes changes in protein expression that might hampers colony maintenance. This work highlights the importance of evaluating pesticide residues in resources collected by bees according doses authorized to crop

spraying and potential impacts of these residues to colony maintenance. Reduction of pesticide use in ecosystems, and of bee's exposure to these molecules avoiding pesticide spraying in blooming crops and with adoption of strategies that include integrated pest management and biological control, and development of more rigorous tests to liberate/reevaluate pesticides are essential strategies to the maintenance of managed colonies and to reduce threats that these molecules represent to non-target species.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	01
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	02
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i> : origem, histórico, aspectos gerais da biologia e importância.....	02
2. A apicultura no Brasil.....	07
3. Principais ameaças para a manutenção das abelhas.....	10
4. Avaliação da toxicidade de agrotóxicos para as abelhas.....	14
5. A exposição de abelhas a agrotóxicos e suas principais implicações.....	16
6. Impactos da exposição de abelhas a inseticidas e fungicidas sistêmicos.....	18
7. Importância das abelhas nutrizas para a colônia e efeitos de sua exposição a agrotóxicos.....	23
8. Proteômica e suas ferramentas de análise.....	28
9. Utilização de ferramentas proteômicas (2D-PAGE) para estudos em abelhas.....	33
10. Justificativa.....	35
11. Hipóteses, objetivos e publicações.....	36
12. Referências.....	37
CAPÍTULO II.....	59
FIELD-RELEVANT DOSES OF THE SYSTEMIC INSECTICIDE FIPRONIL AND FUNGICIDE PYRACLOSTROBIN IMPAIR MANDIBULAR AND HYPOPHARYNGEAL GLANDS IN NURSE HONEYBEES (<i>Apis mellifera</i>).....	60
Abstract.....	60
Introduction.....	61
Results.....	63
Discussion.....	69
Methods.....	73
Acknowledgements.....	77
References.....	77

CAPÍTULO III.....	87
ALTERAÇÕES NO PROTEOMA DA CABEÇA DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> NUTRIZES EXPOSTAS A DOSES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E INSETICIDA FIPRONIL.....	88
Resumo.....	88
Introdução.....	89
Resultados e discussão.....	91
Métodos.....	104
Agradecimentos.....	109
Referências.....	110
CAPÍTULO IV.....	134
IMPLICAÇÕES.....	135

LISTA DE TABELAS E QUADROS

(Capítulo II)

	Página
Table 1. Total acini count in the hypopharyngeal glands of nurse honeybees.....	66

(Capítulo III)

	Página
Quadro 1. Funções biológicas e número de proteínas que apresentaram alterações na expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrizas expostas ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações.....	95
Tabela Suplementar 1. Identificação dos <i>spots</i> proteicos que apresentaram redução de expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrizas expostas por seis dias ao inseticida fipronil (F) e fungicida piraclostrobina (P), de forma isolada e em associação (PF).....	120
Tabela Suplementar 2. Identificação dos <i>spots</i> proteicos que apresentaram aumento de expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrizas expostas por seis dias ao inseticida fipronil (F) e fungicida piraclostrobina (P), de forma isolada e em associação (PF).....	131

LISTA DE FIGURAS

(Capítulo I)

	Página
Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	2
Figura 2. Estruturas para coleta de recursos em <i>Apis mellifera</i>	3
Figura 3. Glândula mandibular em <i>Apis mellifera</i>	25
Figura 4. Glândula hipofaríngeana em <i>Apis mellifera</i>	26

(Capítulo II)

	Página
Figure 1. Effects of individual and combined exposure to pyraclostrobin and fipronil on epithelial cell height of mandibular glands in nurse honeybees.....	64
Figure 2. Classes of cross-sectional areas in the mandibular glands of nurse honeybees exposed to treatments of pyraclostrobin and fipronil both individually and combined.....	65
Figure 3. Cross-sectional areas of acini in hypopharyngeal glands measured in nurse honeybees exposed to treatments of pyraclostrobin and fipronil both individually and combined.....	67
Figure 4. Representative histological sections of hypopharyngeal glands in nurse honeybees.....	68

(Capítulo III)

	Página
Figura 1. Géis 2D PAGE representativos de cabeças de abelhas (<i>Apis mellifera</i>) nutrízes expostas a doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações.....	92
Figura 2. Classificação das sequências das proteínas que apresentaram redução de expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrízes expostas ao fungicida piraclostrobina e ao inseticida fipronil.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – Por cento.

%V – Volume normalizado de um *spot* no gel.

µg – Micrograma.

µm – Micrômetro.

µm² – Micrômetro quadrado.

10-HDA – Ácido trans-10-hidroxi-2-decenóico

2D-PAGE – Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida, do inglês *2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*.

2HPT – 2-heptanona.

ATP – Adenosina Trifosfato.

CCD – Distúrbio do Colapso das Colônias, do inglês *Colony Collapse Disorder*.

cm – Centímetro.

Da – Dalton.

DL₅₀ – Dose Letal Média.

DTT – Ditiotreitól.

ESI – Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*.

ESI-MS/MS – Espectrometria de Massas em sequência com Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry*.

g – Grama.

GABA – Ácido gama amino butírico, do inglês *Gamma-Aminobutyric Acid*.

h – Hora.

ha – Hectare.

i.a. – Ingrediente Ativo.

IAA – Iodoacetamida.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

IEF – Isoeletrofocalização.

kDa – Kilodalton.

km – Quilômetro.

L – Litro.

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*.

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*.

m/v – Massa/Volume.

m/z – Razão Massa/Carga.

mA – Miliampere.

MALDI – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

mg – Miligrama.

Min – Minuto.

Mm – Massa Molecular.

mm – Milímetro.

mM – Milimolar.

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*.

nm – Nanômetro.

°C – Graus Celsius.

pg – Picograma.

pH – Potencial de Hidrogênio.

pI – Ponto Isoelétrico.

ppb – Parte por bilhão.

ppm – Parte por milhão.

QuEChERS – Rápido, Fácil, Econômico, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*.

rpm – Rotação por minuto.

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio.

Spot – Banda 2D de proteínas.

TOF – Tempo de Vôo, do inglês *Time of Flight*.

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry*.

v/v – volume/volume.

Vh – Volt/hora

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera*: origem, histórico, aspectos gerais da biologia e importância

As abelhas *Apis mellifera* L., 1758 são insetos eusociais, holometábolos, pertencentes à ordem Hymenoptera e à família Apidae (WINSTON, 2003; GUPTA, 2014). Dentre os invertebrados, as abelhas representam uma das mais complexas sociedades, com grande capacidade de comunicação, pronunciado dimorfismo sexual e diferenciação entre castas (SEELEY, 1995). As castas são representadas pela rainha, operárias e zangões (Figura 1).

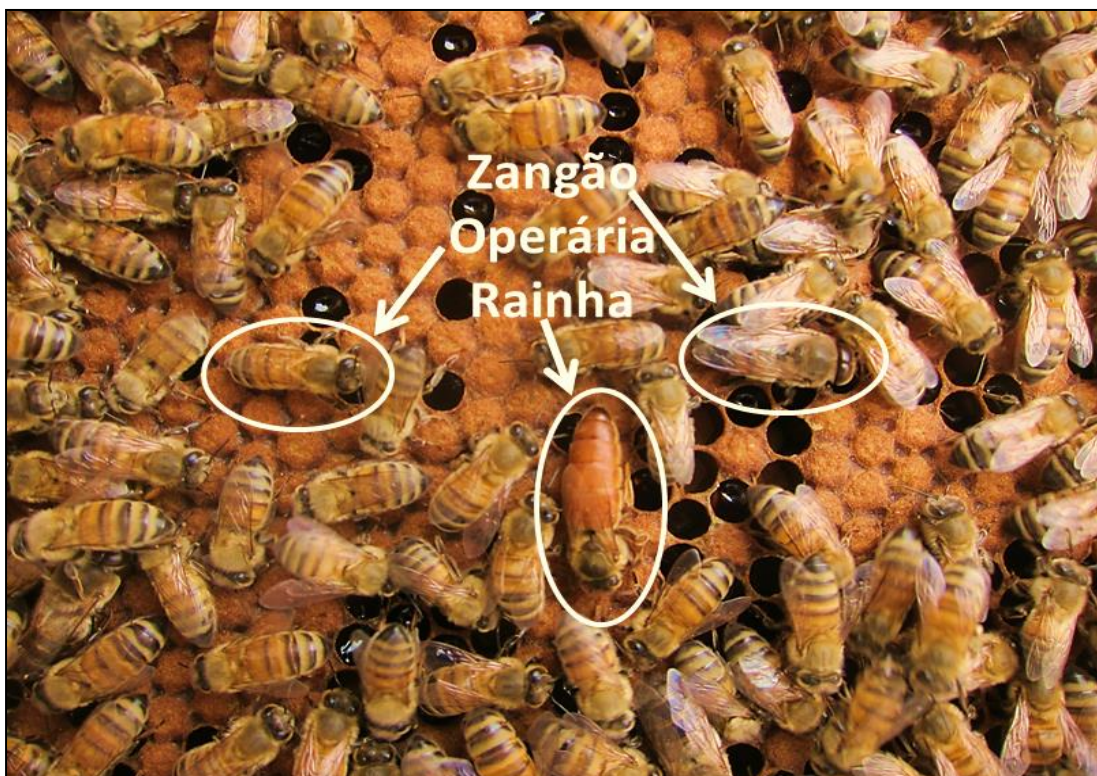


Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de *Apis mellifera*. Adaptado de <https://apiculturesantropol.wordpress.com/tag/worker-bee/>.

As abelhas evoluíram de um grupo de vespas da família Sphecidae, que abandonaram o hábito predatório e passaram a se alimentar exclusivamente de pólen e néctar (DANFORTH, 2007; GUPTA, 2014). Esse processo de evolução iniciou-se entre 100 e 120 milhões de anos atrás, no período Cretáceo Inferior, juntamente com o

aparecimento das plantas angiospermas (MICHENER, 1974). Durante o processo de evolução, as abelhas desenvolveram estruturas que facilitaram a coleta e o transporte de pólen, que passou a ser sua principal fonte proteica. Essas estruturas incluem a prensa-pólen, os pentes e a escova de pólen, localizadas na tíbia e batitarso das pernas metatorácicas das abelhas operárias (DANFORTH, 2007). Essas três estruturas servem para prensar o pólen na corbícula, uma concavidade na face externa da tíbia das abelhas que é característica dos *Apidae* (Figura 2 A, B) (MICHENER, 1974). A corbícula também é utilizada para o transporte de resinas que dão origem à própolis. Além disso, o desenvolvimento de uma língua comprida (probóscide) (Figura 2 C) para coleta de néctar e o hábito de viver em colônias e estocar alimento, favoreceram a adaptação e dispersão das abelhas (GUPTA, 2014).

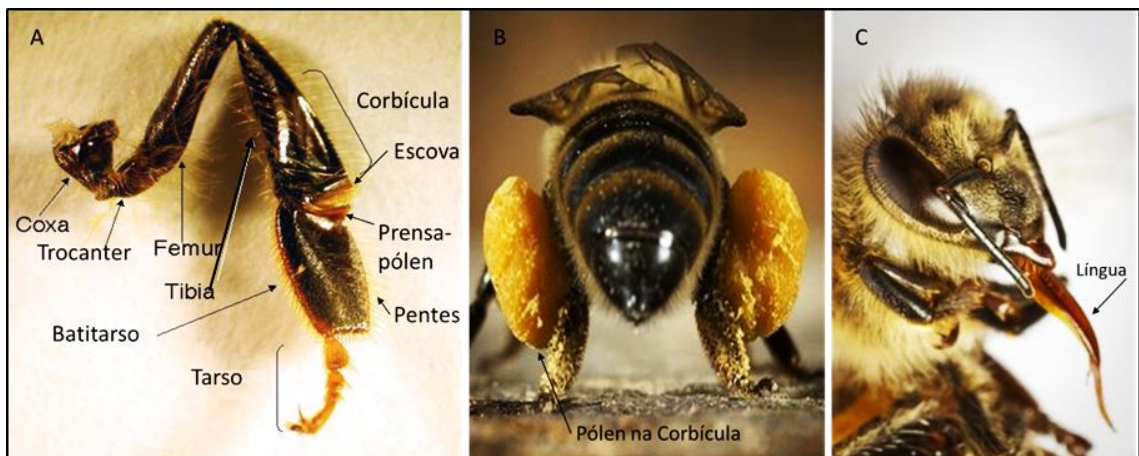


Figura 2. Estruturas para coleta de recursos em *Apis mellifera*. (A) Perna posterior de operária. (B) Detalhe de operária com bolotas de pólen na corbícula. (C) Operária com a língua estendida.

Fontes: (A) Modificado de: <http://articles.extension.org/pages/21756/thorax-of-the-honey-bee>; (B,C) Modificado de: www.pinterest.com.

A co-evolução das plantas angiospermas e abelhas contribuiu para diversificação e propagação desses grupos e para o surgimento de estratégias de polinização especializadas (DANFORTH, 2007; HU et al., 2008). Estima-se que atualmente existam entre 250.000–260.000 espécies de angiospermas (SOLTIS & SOLTIS, 2004); e mais de 40.000 espécies de abelhas, com mais de 25.000 espécies já descritas (GUPTA, 2014).

Aproximadamente, 6% espécies de abelhas são eusociais, enquanto as demais são solitárias ou cleptoparasitas (DANFORTH, 2007). As abelhas melíferas apresentam colônias com comportamento social bem desenvolvido, caracterizado pelo compartilhamento do ninho, cuidado cooperativo das crias (indivíduos adultos cuidam das larvas em desenvolvimento), divisão reprodutiva de trabalho (sem que todos os indivíduos participem da reprodução) e sobreposição de gerações (WILSON, 1975; DANFORTH, 2007). A alta capacidade de adaptação das abelhas permitiu sua sobrevivência em ambientes extremos, como na tundra, desertos e florestas tropicais (SEELEY, 1995).

Com base em estudos do DNA nuclear e mitocondrial (mtDNA) e em características morfológicas e de nidificação, são encontradas dez espécies de abelhas pertencentes ao gênero *Apis*: as abelhas gigantes (*A. dorsata*, *A. laboriosa*, *A. binghami* e *A. nigrocincta*) que constroem ninhos em locais abertos, compostos por um único ou poucos favos (GUPTA, 2014); abelhas anãs (*A. florea* e *A. andreniformis*) que também constroem ninhos em locais abertos, geralmente formados por um único favo (RINDERER et al., 1996); e as abelhas de tamanho médio *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis* e *A. mellifera*, que constroem ninhos em cavidades que são formados por vários favos (RADLOFF, HEPBURN & ENGEL, 2011; GUPTA, 2014). De acordo com Michener (1974), o maior número de espécies de abelhas do gênero *Apis* é encontrado na Índia e regiões adjacentes, com exceção da *A. mellifera*. A origem das abelhas *A. mellifera* não é clara. Estudos realizados por Whitfield et al. (2006) demonstraram que as abelhas *A. mellifera* se originaram na África e se expandiram para a Eurásia em dois momentos, resultando em populações no leste e oeste da Europa que estão geograficamente próximos, mas distantes geneticamente. No entanto, estudos recentes apontam que assim como as demais espécies, as abelhas *A. mellifera*, podem ter surgido na Ásia (HAN, WALLBERG & WEBSTER, 2012; GUPTA, 2014).

As abelhas *A. mellifera* são amplamente distribuídas na Europa, África e Ásia, e independentemente do local de sua evolução, são atualmente encontradas mundialmente, devido às introduções realizadas pelo homem para o desenvolvimento da apicultura. A variabilidade de ambientes onde as abelhas melíferas evoluíram e se adaptaram (savanas, florestas tropicais, desertos, regiões montanhosas), com diferentes condições climáticas e de flora, além da seleção realizada por apicultores para características específicas de

manejo, permitiu o surgimento de diferentes subespécies (raças) de abelhas melíferas. Vinte e nove subespécies de *A. mellifera* podem ser reconhecidas com base na biogeografia, em análises morfométricas e comportamentais (GUPTA, 2014). As subespécies são divididas em cinco grupos principais: Grupo A (que inclui subespécies de toda a África), Grupo M (subespécies da Europa Ocidental e do Norte), Grupo C (subespécies da Europa Oriental), Grupo O (subespécies da Turquia e Oriente Médio) (RUTTNER, 1988; GUPTA, 2014); e o grupo Y (com subespécies da Etiópia) (FRANCK et al., 2001).

O homem iniciou a exploração dos produtos oferecidos pelas abelhas há muito tempo. Pinturas rupestres na África e na Caverna das Aranhas, em Valência – Espanha, datadas de aproximadamente 6.000 a.C., representam a extração de mel realizada pelo homem em enxames selvagens, instalados em fendas de rochas (CRANE, 1999). Após muitos anos de exploração de enxames selvagens, o homem iniciou o processo de criação de abelhas em colmeias (fabricadas com argila, palha, madeira) e passou a agrupar as colmeias em locais específicos a fim de facilitar o manejo. No Egito Antigo e em outras regiões mediterrânicas, existem registros da criação de abelhas em vasos de argila e da colheita de mel em 1450 a.C. (CRANE, 1999). No decorrer de anos de pesquisas, estudos do desenvolvimento das abelhas e do uso de diferentes técnicas para sua criação ao redor do mundo, ocorreu um invento que revolucionou a criação de abelhas. Em 1851, o americano Lorenzo Lorain Langstroth desenvolveu a colmeia de madeira com dimensões apropriadas e quadros móveis, que adotava o “espaço abelha” – um espaço livre entre 4,8 e 9,5 mm em todas as partes da colmeia. Os quadros móveis permitem ao apicultor a inspeção de todos os favos da colmeia sem danificá-los, enquanto o espaço abelha permite a circulação das abelhas, impedindo a construção de favos fora dos quadros, facilitando o manejo das colmeias. A colmeia Langstroth é utilizada até os dias de hoje como padrão na apicultura mundial (CRANE, 1999).

Em uma colônia de *A. mellifera* é encontrada apenas uma rainha, milhares de operárias e algumas centenas ou nenhum zangão; o número de abelhas operárias e de zangões é totalmente dependente das condições climáticas e dos recursos alimentares disponíveis (SEELEY, 1995; WINSTON, 2003).

Todos os indivíduos da colônia passam por três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e pupa. Todas as castas permanecem três dias na fase de ovo e seis dias na fase

de larva; já a fase de pupa varia em função da casta e também da subespécie de abelha, durando em média, sete dias para rainha, quinze dias para os zangões e doze dias para as operárias. O período total de desenvolvimento da rainha, zangões e operárias é em média de 16, 24 e 21 dias, respectivamente (PAGE & PENG, 2001; VAN VEEN, 2014).

A rainha é a única fêmea fértil da colônia, responsável pela postura de ovos que garantem a renovação da população da colônia e pela produção de feromônios, substâncias fundamentais para manutenção da organização social e homeostase da colônia (SEELEY, 1995). A poliandria é uma característica comum no gênero *Apis*, sendo que durante o voo nupcial a rainha acasala em média com 12 zangões, com objetivo de preencher sua espermateca com espermatozoides necessários para manter a taxa de postura de óvulos fecundados durante toda sua vida (ESTOUP, SOLIGNAC & CORNUET, 1994). A abelha rainha vive, em média, um ano em colmeias comerciais (onde pode ser substituída pelos apicultores para garantir boa produção) apresentando alta taxa de postura de ovos e produção de feromônios. Em enxames selvagens, a rainha pode viver por até três anos (PAGE & PENG, 2001).

Os zangões nascem de óvulos não fertilizados que se desenvolvem por partenogênese arrenótoca e não apresentam apêndices desenvolvidos para executar trabalhos dentro ou fora da colmeia. Sua função é a fecundação da rainha. Os zangões são criados em períodos de abundância de alimento e vivem entre 40 e 60 dias; quando copulam com a rainha morrem devida a perda de hemolinfa (PAGE & PENG, 2001).

As abelhas operárias são responsáveis pela realização de todas as atividades da colônia e apresentam divisão de tarefas orientada pela sua idade, denominada polietismo etário. Do primeiro ao terceiro dia de vida, trabalham na limpeza interna da colmeia. Do quarto ao 12º dia, produzem geleia real e alimentam as larvas e a rainha. Do 13º ao 18º dia, produzem cera e constroem os favos. Do 19º ao 20º dia, ficam de guarda no alvado (entrada da colmeia), defendendo o território contra qualquer intruso. A partir do 21º dia, as abelhas operárias fazem os serviços de coleta de recursos: resinas, pólen, néctar e água, quando são denominadas abelhas campeiras (SEELEY, 1995; AMDAM & PAGE, 2010). As abelhas operárias vivem em média três a seis semanas na primavera e no verão, podendo viver cerca de quatro meses durante o inverno (PAGE & PENG, 2001).

A criação racional de abelhas melíferas, conhecida como apicultura, possibilita a obtenção de mel, pólen, própolis, cera, geleia real e apitoxina. Esses produtos apresentam

grande importância nutricional e/ou farmacêutica e a apicultura garante a geração de emprego e renda para milhares de pessoas (CUNHA, 2013). Além da importância na apicultura, as abelhas são polinizadores indispensáveis para a manutenção de ecossistemas, auxiliando na manutenção de áreas de vegetação nativa e melhorando a produção de frutos e sementes (DANFORTH, 2007; KLEIN et al., 2007). A polinização que garante o sucesso reprodutivo de 87% das plantas angiospermas é realizada principalmente por insetos, pássaros e morcegos (OLLERTON, WINFREE & TARRANT, 2011). Em regiões temperadas grande parte da polinização é suprida pelas abelhas melíferas (*A. mellifera*), mamangavas (*Bombus* sp.), abelhas solitárias, vespas e moscas; enquanto nos trópicos, borboletas, mariposas, pássaros e morcegos também apresentam importância (KLEIN et al., 2007). Mundialmente, em torno de 1.500 culturas necessitam ser polinizadas por insetos (KLEIN et al., 2007), sendo que as abelhas melíferas se destacam devido a eficiência, ampla distribuição, possibilidade de serem manejadas e transportadas para efetuar serviços de polinização (HANLEY et al., 2015). O valor da polinização realizada pelas abelhas para a agricultura mundial é superior a 200 bilhões de dólares por ano, e em ecossistemas naturais esse valor é ainda maior (LEBUHN et al., 2013).

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

Atualmente os testes ecotoxicológicos necessários para a autorização do uso de agrotóxicos consideram apenas a toxicidade aguda dessas substâncias para as abelhas melíferas que são indicadores para avaliar os riscos que as moléculas representam para outros polinizadores. Geralmente os testes são conduzidos apenas em laboratório, sem considerar os prejuízos que podem ser decorrentes da exposição dos polinizadores a doses subletais, a exposição repetida das abelhas a essas substâncias e seus efeitos sobre as colônias. Diante do crescente número de estudos que demonstram efeitos negativos da exposição de abelhas a agrotóxicos e dos resultados apresentados no presente trabalho, destaca-se a importância da adoção de estratégias que garantam menor exposição dos polinizadores a essas substâncias, incluindo:

- Adoção de testes mais rigorosos para reavaliação e liberação de agrotóxicos, tendo especial atenção à quantidade de resíduos presentes em recursos coletados pelas abelhas em função das doses autorizadas para sua aplicação. O potencial acúmulo de resíduos devido à aplicação repetida de agrotóxicos em cultivos também deve ser considerado e utilizado para estabelecer restrições da aplicação de agrotóxicos, definindo doses e intervalos de aplicação que evitem a contaminação nociva de recursos coletados por polinizadores.
- Adoção de testes para avaliar a exposição de colônias a doses ambientalmente relevantes de agrotóxicos e restrição da aplicação de moléculas que afetam sua manutenção, principalmente durante a floração de culturas.
- Redução do uso de agrotóxicos nos ecossistemas, com a adoção de estratégias que incluem o Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIP) e de Controle Biológico.
- Maior investimento em pesquisas para desenvolvimento de métodos de controle biológico de pragas e doenças, de forma a garantir a produção mais sustentável de alimentos.
- Adoção de boas práticas durante a aplicação de agrotóxicos, evitando sua pulverização em condições climáticas inapropriadas (principalmente na presença de ventos fortes), uso de super dosagens ou utilizando equipamentos descalibrados.

- Restrição total da aplicação aérea de agrotóxicos altamente tóxicos para polinizadores, visto que essa forma de aplicação apresenta potencial para gerar maior deriva e consequente contaminação de recursos e mortalidade aguda de abelhas em áreas próximas à aplicação.
- Realização de estudos aprofundados sobre os impactos da exposição de abelhas a fungicidas e reavaliação da autorização para aplicação dessas moléculas em cultivos durante a floração e visitação das abelhas.
- Desenvolvimento de políticas que incentivem a agricultura orgânica e sustentável, incluindo linhas de crédito específicas para incentivar essas atividades, visando reduzir o uso de agrotóxicos.
- Aumentar a conscientização dos agricultores sobre os impactos que aplicação inadequada de agrotóxicos ocasiona aos polinizadores e aos ecossistemas.
- Regulamentar e estimular ações de fiscalização para controlar a aplicação de agrotóxicos.
- Estabelecer regras para aplicação de advertências e multas em caso de descumprimento das normas para aplicação de agrotóxicos, especialmente quando ocorre aplicação em doses inadequadas, durante a floração de cultivos e ocasionando a mortalidade de apiários ou meliponários.

Os resultados do presente trabalho apontam para a necessidade de readequar os sistemas de produção agrícola, visando reduzir a utilização de agrotóxicos que podem ser nocivos à manutenção das abelhas e de suas colônias e consequentemente, afetar a preservação dos polinizadores e de toda biodiversidade. A conscientização da sociedade sobre os impactos negativos que o uso inadequado de agrotóxicos gera para a manutenção de polinizadores e da biodiversidade, além da contaminação dos recursos naturais e dos riscos associados à saúde coletiva deve ser priorizada.

Uma sociedade consciente e informada é a chave para que os setores produtivos adotem ações que garantam a produção de alimentos mais saudáveis, de forma sustentável e que respeitem os ecossistemas e a manutenção da vida.