

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, Fa-
culdade 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. Univer- sidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

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 expostos e não-expostos 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 hipofaringeanas 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 nutrízes 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 nutrízes 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 nutrízes 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 hipofaringeana 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 – Ditioneitol.

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 Voo, 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).

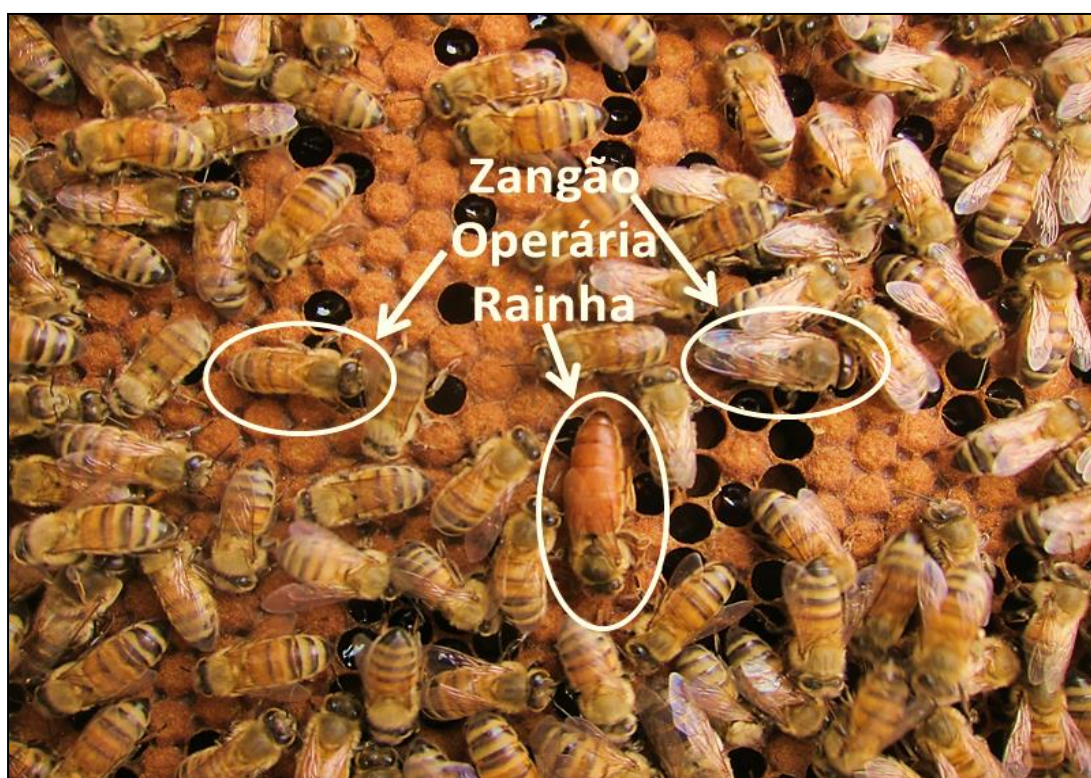


Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de *Apis mellifera*. Adaptado de <https://apiculturesantropol.wordpress.com/tag/worker-bee/>.

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).

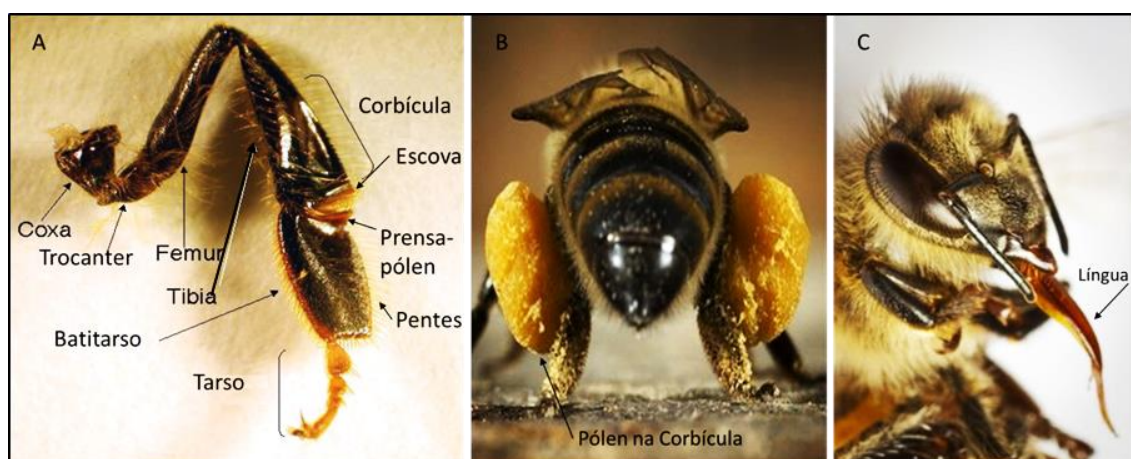


Figura 2. Estruturas para coleta de recursos em *Apis mellifera*. (A) Perna posterior de operária. (B) Detalhe de operária com bolotas de pólen na corbícula. (C) Operária com a língua estendida.

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).

2. A apicultura no Brasil

As abelhas melíferas não são nativas do Brasil e até sua introdução, apenas abelhas sem ferrão eram encontradas no país (NOGUEIRA NETO, 1972). Em 12 de julho de 1839, o imperador Dom Pedro II emitiu um decreto que autorizava o Padre Antônio José Pinto Carneiro a introduzir abelhas europeias no Brasil. Neste ano, cem colônias de *A. m. mellifera* (abelhas pretas ou alemãs) foram trazidas de Porto – Portugal. Destas, apenas sete sobreviveram e foram instaladas no Rio de Janeiro (CRANE, 1999). O principal motivo da introdução de abelhas melíferas no Brasil foi produzir mel e cera, esta última essencial para a fabricação de velas usadas em cerimônias religiosas. Entre 1870 e 1880, também houve introdução de abelhas italianas (*A. m. ligustica*), carnicas (*A. m. carnica*) e caucásicas (*A. m. caucasica*) na região sul do Brasil, trazidas por imigrantes europeus (KERR, 1967; NOGUEIRA NETO, 1972).

Na década de 50, autoridades brasileiras buscaram estratégias para aumentar a produtividade de mel, principalmente considerando as condições climáticas e florais que eram favoráveis ao desenvolvimento da apicultura no país. Baseado em relatos de que na África do Sul, onde a produção de mel do apicultor E.A. Schnetler atingia 70 kg de mel por colmeia/ano, buscou-se estratégias para melhorar a produção de mel no Brasil. Em 1956, o geneticista Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr recebeu um convite do governo brasileiro para viajar a África do Sul, com objetivo de avaliar e coletar rainhas africanas (originalmente foram descritas como *A. m. adansonii* e posteriormente tiveram o nome alterado para *A. m. scutellata*) para sua introdução no Brasil (STORT & GONÇALVES, 1994; GONÇALVES, 2001). Apesar de produtivas, as abelhas africanas tinham comportamento defensivo pronunciado, característica indesejável para a apicultura comercial (GONÇALVES, 2001). Dessa forma, o objetivo da introdução de abelhas africanas no Brasil era realizar um programa de seleção genética visando obter híbridos que tivessem a mansidão das abelhas europeias e a produtividade das abelhas africanas (STORT & GONÇALVES, 1994).

Na época, o professor Kerr coletou 133 rainhas na África do Sul, Moçambique, Angola e Tanganika (atual Tanzânia) e as enviou ao Brasil. Dessas rainhas, apenas 47 sobreviveram e foram introduzidas em colmeias no Horto de Camaquan, no município de Rio Claro – SP. Cada colmeia teve sua entrada protegida por uma tela excludora de rainhas, para evitar que rainhas e zangões saíssem para o ambiente. No entanto, um apicultor visitante removeu as telas excludoras ao observar que as abelhas operárias perdiam grande quantidade de pólen ao entrar nas colmeias. Dessa forma, em 1957 ocorreu a enxameação de 26 colmeias de abelhas africanas que se estabeleceram como enxames selvagens (KERR, 1967; STORT & GONÇALVES, 1994).

Os cruzamentos das abelhas africanas com as linhagens europeias previamente introduzidas no Brasil deram origem a um poli-híbrido fértil, denominado abelha africanizada, que possui características morfológicas e comportamentais predominantemente encontrados nas abelhas *A. m. scutellata*. Essas abelhas apresentam alta capacidade enxameatória, forte comportamento defensivo, alta produtividade, intensa atividade forrageira, resistência a doenças e pragas, e conseguem se adaptar bem a diferentes condições climáticas e geográficas (STORT & GONÇALVES, 1994).

Dentre os fatores que contribuíram para a expansão das abelhas africanizadas na América do Sul, até atingir os Estados Unidos, destaca-se: sua alta capacidade de enxameação (WINSTON, 1980); amplo cruzamento dos zangões africanos com rainhas europeias que ocorreu no Brasil (RINDERER et al., 1985a; CRANE, 1999) e nos EUA (PINTO et al., 2005); maior resistência das abelhas africanizadas a ácaros (MORETTO, GONÇALVES & DE JONG, 1993); alta capacidade de adaptação das abelhas africanizadas; reduzida competição de populações pequenas e pouco adaptadas de abelhas europeias (SHEPPARD et al., 1991; PINTO et al., 2005). Além disso, colônias africanizadas produziam maior número de zangões (RINDERER et al., 1987) e estes por apresentarem livre acesso às colmeias, podiam entrar em colônias europeias e dessa forma inibir a criação de zangões nessas colônias (RINDERER et al., 1985b). Destaca-se também o reduzido tempo de desenvolvimento das abelhas operárias e rainhas africanizadas que pode ter contribuído para o processo de africanização; enquanto abelhas operárias africanizadas se desenvolvem em 19,8 a 20,3 dias (NUNES-SILVA et al., 2006), as abelhas europeias completam seu desenvolvimento em 21 dias (WINSTON, 1987). As rainhas africanizadas completam o desenvolvimento em 15 a 16 dias (NUNES-SILVA et al., 2006), enquanto as rainhas europeias necessitam de 16 dias para o completo desenvolvimento (WINSTON, 2003).

Essas características das abelhas africanizadas permitiram sua rápida expansão pelas Américas, tendo colonizado todo Brasil em 15 anos (TAYLOR, 1977) e ocupado quase toda América do Sul, exceto as regiões abaixo do paralelo 35° na Argentina, possivelmente devido ao frio rigoroso que ocorre nessas regiões (KERR, DEL RIO & BARRIONUEVO, 1982). A Cordilheira dos Andes limitou sua expansão ao Oeste, evitando sua entrada no Chile (DEL LAMA et al., 2004). Após colonizar a América Central, as abelhas africanizadas chegaram ao Texas em 1990, e em 2006, estavam presentes em mais de dez estados no sul dos Estados Unidos (LIVANIS & MOSS, 2010).

As abelhas africanizadas foram fundamentais para expansão da apicultura brasileira e aumento da produtividade. No entanto, logo após a introdução das abelhas africanas e início do processo de africanização, houve um período de caos na atividade, devido à alta defensividade e elevado comportamento de enxameação dessas abelhas. Muitos acidentes ocorreram na época e diversos apicultores deixaram a atividade até o desenvolvimento de estratégias de manejo específicas para trabalhar com as abelhas

africanizadas (GONÇALVES, 2001). Atualmente existem aproximadamente 350.000 apicultores no Brasil, com produção anual média de 50.000 toneladas de mel (CUNHA, 2013); e o Brasil ocupa a oitava posição no ranking mundial de exportação de mel (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE MEL, 2017). O primeiro lugar no ranking de produção e exportação de mel é ocupado pela China, que é seguida da Nova Zelândia, Argentina e Alemanha (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE MEL, 2017).

3. Principais ameaças para a manutenção das abelhas

Estudos demonstram a ocorrência de uma redução global de polinizadores nativos e de abelhas melíferas manejadas (BIESMEIJER et al., 2006; POTTS et al., 2010; BARTOMEUS et al., 2013; ELLIS, 2012; PAUDEL et al., 2015). Somente nos Estados Unidos, o número de colmeias reduziu de 6 milhões em 1940, para 2,3 milhões em 2008 (PETTIS & DELAPLANE, 2010). Em contrapartida, a população mundial apresenta crescimento contínuo e deve atingir nove bilhões em 2040 (WORRALL, 2015), aumentando a demanda pelos serviços de polinização necessários para garantir a produção de alimentos.

A síndrome *Colony Collapse Disorder (CCD)* ou Distúrbio do Colapso das Colônias, descrita em 2006, que afeta diretamente as abelhas melíferas, teve impacto significativo na discussão sobre as possíveis causas da redução global de polinizadores. A CCD é caracterizada pela perda repentina de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou proximidades da colmeia, abandono das crias (ovos, larvas e pupas) e alimento no ninho. Além disso, a síndrome tem como característica a retardada invasão da colmeia por pragas (cleptoparasitas, traças da cera, besouros da colmeia) que comumente atacam colmeias vazias em busca do alimento (COX-FOSTER et al., 2007; VAN ENGELSDORP et al., 2009). Anteriormente ao surgimento da CCD, eram comuns perdas anuais de até 10% das colmeias, índice que pode ser considerado aceitável (OLDROYD, 2007). No entanto, a partir de 2006/2007, alguns países registraram perdas superiores a 50% dos seus enxames (NEUMANN & CARRECK, 2010); nos Estados Unidos entre 2006 e 2008, as perdas alcançaram em média 30% das colmeias (PETTIS & DELAPLANE, 2010). Entre 2012 e 2014, as perdas anuais nos

Estados Unidos variaram de 45 a 51% das colmeias (STEINHAUER et al., 2014; LEE et al., 2015).

Dentre as principais causas da redução global de polinizadores e que também são ligadas a CCD, destacam-se: a fragmentação e o desmatamento de áreas com vegetação nativa; mudanças climáticas; aparecimento e disseminação de doenças e parasitas; introdução de espécies exóticas e cultivos transgênicos e uso excessivo de agrotóxicos. Essas alterações em conjunto aumentam a pressão sobre as populações de polinizadores nativos e manejados, reduzindo sua diversidade e prejudicando sua manutenção (GOULSON et al., 2015).

A fragmentação e o desmatamento de áreas de vegetação nativa para a intensificação da agricultura, pecuária e expansão das cidades representam as principais mudanças no uso da terra que ameaçam os ecossistemas e afetam sua biodiversidade. Essas atividades reduzem a disponibilidade de locais de nidificação e de recursos alimentares (néctar e pólen) que são necessários para a manutenção dos polinizadores (KREMEN et al., 2007).

O impacto das mudanças climáticas sobre as abelhas não é totalmente conhecido. Apesar da ampla distribuição e potencial adaptativo das abelhas do gênero *Apis*, as mudanças ambientais podem afetar o comportamento e a fisiologia das abelhas (LE CONTE & NAVAJAS, 2008). Mudanças climáticas podem afetar a disponibilidade de recursos florais no ambiente, afetando diretamente o desenvolvimento das colônias, sua capacidade de produção e manutenção. Alterações na distribuição de algumas espécies de abelhas e de alguns parasitas e doenças em função das mudanças climáticas poderão desencadear alterações em algumas práticas na apicultura. Essas alterações incluem a intensificação dos serviços de transporte de abelhas para efetuar serviços de polinização de cultivos agrícolas e importação de novas raças de abelhas para verificar sua adaptação às novas condições ambientais (LE CONTE & NAVAJAS, 2008).

O aparecimento e disseminação de novos parasitas e doenças representa ameaça à manutenção dos polinizadores. Dentre os principais parasitas que afetam a apicultura atualmente, destaca-se o ácaro *Varroa destructor*, ectoparasita que se alimenta da hemolinfa das abelhas adultas e de pupas (GAREDEW, SCHMOLZ & LAMPRECHT, 2004) e é responsável por transmitir viroses e prejudicar o sistema imune das abelhas (RAVOET et al., 2013). Destacam-se, ainda, o ácaro *Acarapis woodi* (GARRIDO-

BAILÓN et al., 2012), os fungos *Nosema ceranae* e *N. apis* (HIGES et al., 2008; LE CONTE & NAVAJAS, 2008), as doenças bacterianas (Cria Pútrida Americana e Cria Pútrida Europeia), as doenças virais (Deformed Wing Virus, Acute Bee Paralysis Virus e Israeli Acute Bee Paralysis Virus) (RAVOET et al., 2013) e a presença de cleptoparasitas como o besouro da colmeia *Aethina tumida* (HOOD, 2015).

A introdução accidental ou intencional de espécies exóticas em um ecossistema pode gerar competição por recursos alimentares e áreas de nidificação, além de trazer novas doenças e parasitas, o que pode comprometer a sobrevivência de espécies de polinizadores nativos presentes no ecossistema (STOUT & MORALES, 2009). A introdução de plantas e abelhas exóticas pode prejudicar populações de abelhas nativas (AIZEN, MORALES & MORALES, 2008; STOUT & MORALES, 2009). As introduções de abelhas melíferas e posterior expansão das abelhas africanizadas nas Américas são discutidas por muitos autores, entretanto, efeitos negativos ou prejuízos diretos à manutenção de espécies de abelhas nativas não foram observados (WILMS, IMPERATRIZ-FONSECA & ENGELS, 1996; PAINI, 2004; ROBIN, MORITZ & NEUMANN, 2005; SANTOS et al., 2012). Destaca-se também que as abelhas melíferas podem assumir importante papel como polinizadoras em locais onde as populações de abelhas nativas são extintas ou reduzidas por fatores antrópicos (SANTOS et al., 2012).

O desenvolvimento e a expansão de cultivos geneticamente modificados que podem produzir proteínas inseticidas, inibidores de proteases, quitinases, lectinas, entre outras, tem gerado discussões sobre a segurança dessas tecnologias para as abelhas. A exposição direta das abelhas a proteínas transgênicas e as potenciais alterações fenotípicas em plantas transgênicas que podem alterar a qualidade nutricional e a atratividade dos recursos florais, tem sido apontados como principais riscos do uso desses cultivos para os polinizadores (PHAM-DELÈGUE, JOUANIN & SANDOZ, 2002; MALONE & PHAM-DELÈGUE, 2002). Estudos conduzidos em laboratório utilizando a exposição de abelhas adultas a algumas proteínas transgênicas purificadas (PHAM-DELÈGUE, JOUANIN & SANDOZ, 2002; MALONE & PHAM-DELÈGUE, 2002; DAI et al., 2012); e em campo, avaliando a exposição de abelhas nutrizes em colônias implantadas em milho transgênico (HENDRIKSMA et al., 2013) não encontraram efeitos tóxicos. Entretanto, estudos realizados por Ramirez-Romero et al. (2008) demonstraram que cultivos transgênicos que expressam a proteína Cry1Ab podem afetar o consumo de

alimento e o processo de aprendizagem em abelhas, podendo comprometer sua atividade de forrageamento. É importante considerar que grande parte dos estudos que avaliaram os efeitos de proteínas transgênicas em abelhas foi conduzida em laboratório, utilizando abelhas adultas, durante breves períodos de exposição. Essas avaliações não consideram possíveis alterações nas interações sociais e no comportamento que ocorrem em colônias; os efeitos em diferentes gerações e sobre o desenvolvimento de diferentes castas, além de não considerar potenciais efeitos cumulativos e sinérgicos da exposição das abelhas a diferentes proteínas transgênicas, patógenos e agrotóxicos.

Todas as alterações discutidas até aqui tem importância na redução de polinizadores nativos e manejados, no entanto, o uso excessivo de agrotóxicos é um dos fatores mais preocupantes para sua manutenção. Durante sua história evolutiva, as abelhas vêm se adaptando e sobrevivendo às mudanças climáticas, presença de predadores, parasitas, doenças, substâncias tóxicas que podem ser encontradas no néctar/pólen de algumas plantas e outras alterações naturais dos ecossistemas (LE CONTE & NAVAJAS, 2008; PARKER et al., 2010). No entanto, a introdução de moléculas tóxicas nos ecossistemas pelo homem, a fim de controlar pragas e doenças resultantes de processos produtivos intensos que provocam amplo desequilíbrio ecológico, têm provocado profunda contaminação do ar, solo, águas superficiais e subterrâneas; e alterações na fauna e flora, afetando também os polinizadores (AKTAR, SENGUPTA & CHOWDHURY, 2009; CARSON, 2010).

A produção de substâncias químicas sintéticas iniciou-se na Segunda Guerra Mundial. Posteriormente, houve intenso investimento em pesquisa e desenvolvimento de moléculas que podiam ser usadas na agricultura e pecuária, a fim de controlar insetos-praga, plantas daninhas, doenças, parasitas e outras ameaças às atividades humanas. A síntese de compostos químicos orgânicos que incluíram o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), paration, malation, clordano, dieldrina, aldrina, endrina, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BHC (hexacloreto de benzeno) precedeu o desenvolvimento de uma indústria química multimilionária (CARSON, 2010). Atualmente existem mais de 6.400 ingredientes ativos, metabólitos, adjuvantes e solventes utilizados mundialmente em formulações comerciais de agrotóxicos (PAN PESTICIDE ACTION NETWORK, 2017).

Considerando o uso de agrotóxicos no Brasil ressalta-se o cenário preocupante para a manutenção dos polinizadores e de toda biodiversidade, além de riscos para a saúde pública devido a utilização desses produtos. Desde 2008, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos; atualmente existem cerca de 430 ingredientes ativos e 1.400 formulações de agrotóxicos autorizados para uso pelo Ministério da Saúde e Ministério do Meio Ambiente; e registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Dos 50 produtos mais utilizados nas lavouras brasileiras, 22 são proibidos na União Europeia. Entre 2000 e 2012 houve aumento de 288% (em US\$) e 162% (em toneladas) na venda de agrotóxicos no Brasil; em 2011 foram usados 852,8 milhões de litros dessas substâncias (CARNEIRO et al., 2015).

4. Avaliação da toxicidade de agrotóxicos para as abelhas

Os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e ambientes urbanos, hídricos e industriais. Esses produtos agem de forma a alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos e incluem também as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Por definição, os ingredientes ativos (i.a.) ou princípios ativos representam o agente químico, físico ou biológico que confere eficácia aos agrotóxicos (BRASIL, 2002).

Um dos parâmetros utilizados na mensuração da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas é a determinação da DL_{50} (Dose Letal Média). Esse parâmetro determina a quantidade de um i.a. capaz de matar 50% da população exposta por ingestão ou contato a um produto, geralmente em um período de 24 ou 48h (DEVILLERS, 2002). Os primeiros testes de toxicidade de agrotóxicos para abelhas foram desenvolvidos em 1960; anteriormente, os efeitos nocivos dessas substâncias aos polinizadores eram ignorados, não havendo restrições para seu uso (CLUZEAU, 2002).

Baseado no resultado dos testes de toxicidade para abelhas, os agrotóxicos podem ser classificados em três categorias: Altamente Tóxicos ($DL_{50} < 2 \mu\text{g/abelha}$);

Moderadamente Tóxicos (DL_{50} entre 2 e 11 $\mu\text{g}/\text{abelha}$); e Relativamente Não Tóxicos ($DL_{50} > 11 \mu\text{g}/\text{abelha}$) (DEVILLERS, 2002; CLUZEAU, 2002).

Com a determinação da DL_{50} é possível calcular o quociente de risco (*Hazard Quotient* – HQ) para a exposição das abelhas por contato e ingestão em campo. Esse parâmetro considera a dose máxima de aplicação de um i.a. em determinada cultura e o valor da DL_{50} :

$$\text{HQ } (\mu\text{g i. a.}/\text{abelha}) = \frac{\text{Dose (g i. a./ha)}}{DL_{50_{\text{ingestão ou contato}}} (\mu\text{g i. a.}/\text{abelha})}$$

Diferentes tipos de testes são solicitados quando o valor do HQ é maior que 50. Esses testes incluem: testes de resíduos em folhagem, testes em gaiolas para observar a mortalidade e comportamento das abelhas, testes em túneis e em campo para avaliar os efeitos diretamente sobre as colônias de abelhas. Devido aos altos custos, na maioria das vezes os testes em túneis e em campo não são realizados (DEVILLERS, 2002). Com base nos resultados desses testes, a aplicação dos agrotóxicos durante a floração de culturas pode ser proibida, assim como podem ser definidas doses e intervalos de aplicação específicos para um i.a., visando reduzir os danos causados pela exposição das abelhas a esses produtos.

Apesar dos valores de DL_{50} serem importantes para demonstrar a toxicidade aguda dos agrotóxicos para as abelhas, esses testes não consideram os efeitos da exposição das abelhas a doses subletais (inferiores a DL_{50}), sua exposição repetida a esses produtos e os efeitos das interações entre diferentes i.a. a que as abelhas são expostas em campo (CLUZEAU, 2002; PISA et al., 2015).

É importante considerar também que os testes de toxicidade dos i.a. para regularização dos agrotóxicos são realizados apenas utilizando as abelhas melíferas, sem considerar sua toxicidade para os polinizadores nativos. Estudos demonstram que as abelhas nativas são mais sensíveis ao efeito de agrotóxicos quando comparadas as abelhas melíferas (MAYER & LUNDEN, 1999; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013a; SARTO et al., 2014; COSTA et al., 2015; LOURENÇO et al., 2015), o que aumenta os riscos da perda desses polinizadores. No Brasil, a avaliação dos riscos de i.a. de agrotóxicos para insetos polinizadores é atualmente realizada utilizando as abelhas melíferas como organismos indicadores (BRASIL, 2017b).

5. A exposição de abelhas a agrotóxicos e suas principais implicações

A intensa capacidade de forrageamento das abelhas melíferas torna esses insetos especialmente suscetíveis à exposição a agrotóxicos que são utilizados em campo. As abelhas efetuam diversos voos em busca de alimento (néctar e pólen), água e resinas, a fim de suprir as necessidades da colônia e garantir estoques de alimento para períodos de escassez de floradas. As abelhas melíferas podem coletar recursos a mais de 9,5 km das colmeias, com distância média de forrageamento de 5,5 km (BEEKMAN & RATNIEKS, 2000). Devido à atividade de forrageamento as abelhas podem coletar e acumular recursos contaminados em uma ampla área no entorno da colônia, sendo consideradas bioindicadores de contaminação ambiental (DEVILLERS, 2002).

Além da exposição das abelhas a contaminantes presentes no ambiente, em alguns países, a aplicação de acaricidas e antibióticos diretamente na colmeia para combater doenças e parasitas representa importante forma de exposição das abelhas a produtos químicos (ELLIS, 2012). No Brasil, essas práticas não são necessárias devido à resistência das abelhas africanizadas as principais pragas e doenças que podem afetar as colônias (MORETTO, GONÇALVES & DE JONG, 1993; NEUMANN & CARRECK, 2010; FRIES, 2011).

Em campo, as abelhas podem ser expostas aos agrotóxicos por contato direto, indireto ou por ingestão (SANCHEZ-BAYO & GOKA, 2014). A exposição por contato direto ocorre quando as abelhas forrageiam em uma área durante a aplicação de um agrotóxico; na exposição por contato indireto e ingestão, as abelhas coletam recursos florais (néctar e pólen) ou água contaminados uma área previamente tratada. A toxicidade e a persistência dos agrotóxicos após sua aplicação são específicas para cada molécula e dependem das doses utilizadas e das condições climáticas (RENZI, 2013). A dispersão de poeira contaminada com inseticidas sistêmicos que são usados durante a semeadura de culturas para áreas de vegetação silvestre foi comprovada (GREATTI et al., 2006; GIROLAMI et al., 2011); assim como a presença desses inseticidas na gutação de folhas em culturas que tiveram suas sementes tratadas (GIROLAMI et al., 2009) e em poças d'água em campos tratados (SAMSON-ROBERT et al., 2014). A coleta de recursos contaminados em plantas nativas que crescem próximo a áreas tratadas com agrotóxicos também é importante via de exposição crônica dos polinizadores (BOTÍAS et al., 2015; LONG & KRUPKE, 2016).

Alguns agrotóxicos trazem instruções que proíbem sua aplicação durante períodos de floração de culturas; no entanto, mesmo quando essas instruções são respeitadas, a exposição das abelhas não é descartada, devido à contaminação da vegetação em áreas próximas de campos tratados e ao prolongado efeito residual dessas moléculas (GIROLAMI et al., 2009; RENZI, 2013; BOTÍAS et al., 2015; LONG & KRUPKE, 2016).

Normalmente as áreas agrícolas são tratadas com diferentes agrotóxicos ao longo do ciclo das culturas, utilizando misturas de diferentes produtos e aplicações repetitivas a fim de controlar determinadas pragas. A aplicação de agrotóxicos em condições climáticas inapropriadas (principalmente na presença de ventos fortes); utilização de super dosagens, equipamentos descalibrados (DORNELLES et al., 2009) e a pulverização aérea, podem contribuir para o aumento da contaminação ocasionada por esses produtos (PIMENTEL, 1995; BIRD, ESTERLY & PERRY, 1996; DAMALAS, 2015).

Quando os recursos coletados pelas abelhas apresentam concentrações de agrotóxicos superiores ou iguais a DL_{50} , ocorre à contaminação aguda das abelhas, o que provoca sua mortalidade em curto espaço de tempo. Já, na exposição crônica quando as abelhas são expostas a doses subletais (inferiores a DL_{50}), a alta mortalidade não é esperada; no entanto, diversas alterações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e neurológicas podem ocorrer, comprometendo o bem estar e a manutenção das colônias (SANCHEZ-BAYO & GOKA, 2014).

As abelhas são expostas ao longo do seu desenvolvimento e vida adulta a diversos agrotóxicos, geralmente em doses subletais (MULLIN et al., 2010; KRUPKE et al., 2012; SANCHEZ-BAYO & GOKA, 2014). Atualmente, os herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas são as classes de agrotóxicos mais utilizadas mundialmente (CARNEIRO et al., 2015). Os inseticidas são frequentemente associados aos maiores prejuízos causados aos polinizadores; no entanto, as demais classes de agrotóxicos também podem ter efeitos negativos a sua manutenção (CLUZEAU, 2002). Durante muito tempo, os herbicidas foram classificados como seguros para as abelhas, entretanto, atualmente esse conceito vem sofrendo alterações. Pesquisas demonstram que o uso intensivo e prolongado de herbicidas reduz a diversidade de plantas que fornecem néctar e pólen para as abelhas, prejudicando sua manutenção (HALD, 1999; HYVONEN &

SALONEN, 2002; GOULSON et al., 2015). Além disso, estudos comprovam que abelhas expostas a doses subletais de herbicidas (glifosato) tem a capacidade cognitiva prejudicada, afetando o retorno das abelhas as colmeias, quando estas são expostas a doses comumente encontradas em campo (BALBUENA et al., 2015).

A combinação de inseticidas e fungicidas é muito mais prejudicial para as abelhas que sua exposição isolada a uma única classe desses agrotóxicos (JOHNSON et al., 2013). Pettis et al. (2013) detectaram 35 diferentes agrotóxicos em pólen coletado por *A. mellifera*, sendo verificada maior susceptibilidade das colônias a infecções por *N. ceranae* quando o pólen apresentava resíduos de inseticidas e fungicidas. O uso de agrotóxicos sistêmicos, que geralmente apresentam prolongado efeito residual tem sido motivo de preocupação para a manutenção dos polinizadores. Nos últimos anos, o uso profilático de fungicidas e inseticidas sistêmicos em cultivos agrícolas vem sendo ampliado (IVIC, 2010; SAMSON-ROBERT et al., 2014) aumentando a exposição das abelhas a essas substâncias. Os agrotóxicos sistêmicos após serem aplicados são absorvidos e chegam ao floema das plantas, contaminando o néctar, pólen e resinas que podem ser coletados pelas abelhas (GIROLAMI et al., 2009; RENZI, 2013). A presença de inseticidas e fungicidas sistêmicos em pólen já foi comprovada em diversos estudos (CHAUZAT et al., 2006; SMODIŠ ŠKER et al., 2009; DAVID et al., 2015), bem como a presença de inseticidas sistêmicos em flores de culturas não tratadas que foram implantadas em áreas previamente tratadas (BONMATIN et al., 2003).

6. Impactos da exposição de abelhas a inseticidas e fungicidas sistêmicos

Dentre os inseticidas sistêmicos mais utilizados mundialmente para o controle de pragas destacam-se os fenilpirazois (fipronil) e neonicotinoides (imidaclopride, tiametoxan, clotianidina, acetamiprid, thiacloprid, dinotefuran e nitenpyram) (TANNER & CZERWENKA, 2011; SIMON-DELISO et al., 2015) representando aproximadamente um terço do mercado mundial de inseticidas (SIMON-DELISO et al., 2015).

O fipronil é um inseticida neurotóxico e atua sobre o neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA) e sobre os canais de cloro ativados pelo glutamato (GluCls) (HAINZL & CASIDA, 1996; ZHAO et al., 2004). O GABA atua como inibidor do estímulo nervoso na membrana pós-sináptica, reestabelecendo o estado de repouso do

sistema nervoso central e muscular, aumentando a permeabilidade da membrana aos íons Cl^- . A ação antagonista do fipronil sobre o neurotransmissor GABA, impede a entrada dos íons Cl^- no neurônio após um impulso, resultando em atividade neural excessiva, tremores, paralisia e morte dos insetos (NARAHASHI et al., 2010).

O fipronil é altamente tóxico para *A. mellifera* adultas apresentando DL_{50} de 0,19 e 0,009 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, para exposição via ingestão e contato, respectivamente (ZALUSKI et al., 2015). A degradação do fipronil no ambiente pode levar a formação dos metabólitos fipronil sulfona, fipronil dissulfenil, fipronil sulfeto e fipronil amida (GUNASEKARA & TROUNG, 2007) que também apresentam alta toxicidade (ZHAO et al., 2004). O tempo de vida médio desses compostos no ambiente varia de acordo com as condições ambientais, tipo de substrato e dose aplicada, podendo variar de 111–350 dias (GUNASEKARA & TROUNG, 2007), representando alto risco de contaminação de organismos não alvos da sua aplicação.

O uso do fipronil é proibido na França, Itália, Alemanha e Eslovênia (GHISI et al., 2011) e no Uruguai (PAREJA et al., 2011), devido a elevada toxicidade desse inseticida para os polinizadores. Em contrapartida, no Brasil, o inseticida fipronil apresenta autorização do MAPA para comercialização em diversas formulações utilizadas em campo, incluindo: isca granulada – Blitz[®] (0,03 g/kg) usada como formicida com aplicação terrestre; Termidor 25 CE[®] - 2,5% (usado como formicida, carrapaticida e cupinicida com aplicação terrestre); granulado dispersível - Tuit[®] Florestal - 800g i.a./kg usado como cupinicida; suspensão concentrada – Standak[®] (250 g/L) usado no tratamento de sementes; granulado – Regent[®] 20 G (20 g/kg) com aplicação no solo; granulado dispersível – Regent[®] 800 WG (800 g/kg) com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada – Klap[®] (200 g/L) com aplicação terrestre e aérea. O fipronil é utilizado para o controle de pragas nas culturas de algodão, arroz, batata, cana de açúcar, milho, soja, cevada, feijão, trigo, pastagens e eucalipto (BRASIL, 2017a; BASF, THE CHEMICAL COMPANY, 2017a).

Considerando os efeitos adversos as abelhas associados aos inseticidas sistêmicos, a pulverização aérea de fipronil e dos neonicotinoides (imidaclopride, tiametoxam e clotianidina) foi suspensa no Brasil em Julho de 2012 pelo IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (BRASIL, 2012). A restrição da pulverização aérea tinha como objetivo reduzir a exposição dos polinizadores aos

inseticidas altamente tóxicos, já que esse modo de aplicação pode produzir o cenário de maior deriva e exposição para as populações de abelhas. No entanto, essa normativa teve curta duração. Em 28 de dezembro de 2012, a Secretaria de Defesa Agropecuária e o IBAMA, por meio da Instrução Normativa Conjunta (BRASIL, 2013), restringiu a proibição da pulverização aérea de fipronil e dos neonicotinoides apenas durante a floração de culturas, imediatamente antes do florescimento ou quando for observada visitação de abelhas na cultura. A legislação atual prevê que os produtores rurais que desejem realizar pulverizações aéreas devem notificar os apicultores em um raio de 6 km das propriedades onde os produtos serão aplicados, com antecedência mínima de 48 horas (BRASIL, 2013). A comunicação da pulverização aérea com antecedência tem por objetivo advertir o apicultor para que as colmeias sejam transportadas para um local distante da pulverização e evitar a mortalidade aguda das abelhas. Essa medida pode auxiliar no manejo de colmeias de abelhas melíferas em áreas sujeitas a pulverizações aéreas; no entanto, não considera os efeitos nocivos da aplicação aérea desses produtos para polinizadores nativos.

A detecção de fipronil e de metabólitos provenientes de sua degradação no pólen e mel (CHAUZAT et al., 2006; PAREJA et al., 2011) confirma a exposição das abelhas a esse inseticida. Em países da União Europeia a aplicação do fipronil é permitida em doses entre 17,5 e 44 g i.a/ha. Cultivos tratados com essa quantidade de ingrediente ativo apresentaram, respectivamente, 2,3 e 6,4 μg fipronil kg^{-1} de pólen (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013b). No entanto, o uso do fipronil em países da América Latina, em algumas culturas é autorizado em doses entre 80 e 400 g i.a/ha (BASF, THE CHEMICAL COMPANY, 2017a). Estudos demonstram que a quantidade de resíduos de fipronil em pólen coletado pelas abelhas varia de 2,3 a 28,5 μg kg^{-1} (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013b; MULLIN et al., 2010).

A exposição de abelhas a doses subletais de fipronil compromete a aprendizagem olfatória e a memória (BERNADOU et al., 2009); provoca alterações motoras e comportamentais (ZALUSKI et al., 2015; BOVI, ZALUSKI & ORSI, 2017) e prejudica a síntese de adenosina trifosfato (ATP) devido a inibição da bioenergética mitocondrial (NICODEMO et al., 2014). A exposição de colônias em campo a doses subletais de fipronil resulta em redução da postura da rainha, eclosão de ovos, desenvolvimento de

larvas e pupas, letargia de abelhas adultas e, subsequente, colapso da colônia (ZALUSKI et al., 2015).

Em relação ao uso de fungicidas sistêmicos, destaca-se o grupo químico das estrobilurinas, cujo principal ingrediente ativo é a piraclostrobina. O fungicida piraclostrobina atua sobre a enzima quinona oxidase, por ligação ao complexo III (citocromo bc1) da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias, inibindo a formação de ATP. Essa molécula apresenta ação protetiva, inibindo a germinação de esporos, o desenvolvimento e penetração dos tubos germinativos, proporcionando também maior atividade metabólica das plantas (aumento da atividade da enzima nitrato redutase) resultando em melhoria na sanidade da planta (ANKE 1995; SPIEGEL & STAMMLER, 2006). É importante destacar que a enzima alvo da piraclostrobina está presente em todos os metazoários (SACCONE, LANAVE & DE GRASSI, 2006), o que possibilita a ocorrência de alterações em espécies não alvos da aplicação desse fungicida, incluindo as abelhas (JOHNSON & PERCEL, 2013).

Diferentemente dos inseticidas que atuam sobre o sistema nervoso dos insetos, os fungicidas podem afetar diversas estruturas biológicas, prejudicando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, afetando a estrutura e função da membrana celular, transdução de sinais, respiração, mitose e divisão celular (YANG et al., 2011). Os fungicidas que comprometem a função mitocondrial podem afetar a imunidade inata por suprimir vias biossintéticas e prejudicar a sinalização imunológica que é dependente do consumo de oxigênio e da produção de ATP, responsável pelo fornecimento de energia para maioria das funções celulares (ARNOULT et al., 2009).

Os fungicidas apresentam baixa toxicidade aguda para abelhas adultas (JOHNSON, 2015) e, geralmente, são aplicados em diversas culturas, de maneira preventiva ou curativa, podendo contaminar os recursos coletados pelas abelhas, principalmente devido a não possuírem restrições de aplicação durante a floração (PETTIS et al., 2013). A falta de restrições para a aplicação de fungicidas contribui para ampla detecção desses agrotóxicos em colmeias (MULLIN et al., 2010).

A piraclostrobina é considerada pouco tóxica para *A. mellifera*, apresentando DL₅₀ de 73,47 µg/abelha (BASF, THE CHEMICAL COMPANY, 2017b). O principal metabólito resultante da degradação da piraclostrobina é o desmetoxi 500M07. Estudos realizados em laboratório e em campo demonstraram que o tempo de degradação da

piraclostrobina é de 163 e 230 dias, respectivamente. Em solo, o metabólito 500M07 tem persistência superior a 529 dias (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010).

No Brasil, o fungicida piraclostrobina apresenta autorização para comercialização em diversas formulações para aplicações terrestres e/ou aéreas, incluindo: Comet[®] (250 g/L); Opera[®] XE (81 g/L); Ativum EC (81 g/L); Orkestra[®] SC (333 g/L); Standak[®] Top (25 g piraclostrobina/L) + Fipronil (250 g/L). A piraclostrobina é utilizada em pulverizações foliares para o controle de pragas nas culturas de algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, feijão, maçã, manga, mamão, melão, melancia, milho, pepino, pimentão, soja, tomate, trigo, uva e eucalipto, em doses que variam de 75 a 200g i.a./ha (BRASIL, 2017a). Estudos demonstram que a quantidade de resíduos de piraclostrobina em pólen coletado pelas abelhas varia de 2,7 a 3.480 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (DAVID et al., 2015; FRAZIER et al., 2015), com detecção de valores médios que chegam a 10.458 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em pólen de amêndoas (FRAZIER et al., 2015).

Estudos demonstram que alguns fungicidas podem agir em sinergismo com inseticidas, aumentando a toxicidade de alguns neonicotinoides para as abelhas entre 6 e 84 vezes (IWASA et al., 2004). Os efeitos da exposição das abelhas a fungicidas são, geralmente, mais visíveis em abelhas em desenvolvimento (crias) (MUSSEN, LOPEZ & PENG, 2004; ZHU et al., 2014). Mussen et al. (2004) verificaram que a exposição de larvas a dieta contaminada com fungicidas em doses ambientalmente relevantes, pode ocasionar 100% de mortalidade, impedindo completamente o desenvolvimento de abelhas adultas. Estudos realizados por DeGrandi-Hoffman et al. (2013) demonstraram que a exposição de colônias ao inseticida clorpirifós (usado no controle do ácaro *V. destructor*) e ao fungicida Pristine[®] (formulação contendo boscalide e piraclostrobina), isoladamente e principalmente em associação, reduzem a emergência de rainhas e comprometem a imunidade desses insetos (aumentando a titulação de vírus em abelhas expostas). Além dos efeitos fisiológicos para abelhas em desenvolvimento, o uso de fungicidas pode prejudicar a manutenção de fungos benéficos, responsáveis pela preservação e digestão do pólen da colônia, reduzindo o valor nutricional desse alimento para as abelhas (ANDERSON et al., 2011; ENGEL, MARTINSON & MORAN, 2012; YODER et al., 2013).

Estudos realizados por Pettis et al. (2013) verificaram que abelhas expostas ao fungicida piraclostrobina foram três vezes mais suscetíveis a infecção por *N. ceranae*. Johnson e Percel (2013) demonstraram que a piraclostrobina pode ser detectada na geleia real secretada por abelhas que consomem pólen contaminado com esse fungicida, o que pode afetar a rainha e o desenvolvimento das larvas, causando efeitos crônicos que prejudicam a sobrevivência das colônias.

7. Importância das abelhas nutrizas para a colônia e efeitos de sua exposição a agrotóxicos

As abelhas vivem em sociedades organizadas, consideradas como superorganismos (DANFORTH, 2007; AMDAM & PAGE, 2010) e alterações provocadas por agrotóxicos em um grupo de indivíduos pode prejudicar toda colônia (HEYLEN et al., 2011). Uma das fases de maior especialização das abelhas operárias, necessárias para a manutenção da colônia, ocorre na fase de nutriz, quando as glândulas mandibulares e hipofaríngeas produzem uma secreção proteica denominada geleia real (CRAILSHEIM, 1998; HRASSNIGG & CRAILSHEIM, 1998; PINTO et al., 2012). Essas glândulas localizadas na cabeça das abelhas são estimuladas pela presença de feromônios liberados pela cria e são dependentes da presença de proteínas (derivadas do pólen) para o completo desenvolvimento (DESEYN & BILLEN, 2005; HRASSNIGG & CRAILSHEIM, 1998). As glândulas hipofaríngeas são vestigiais em zangões e rainhas (SNODGRASS, 1956); enquanto as glândulas mandibulares são menores em operárias e zangões, quando comparadas as glândulas de rainhas (LANDIM, 2009).

As glândulas hipofaríngeas produzem a maior parte dos componentes da geleia real e sua secreção tem aparência clara e aquosa; já a secreção das glândulas mandibulares tem constituição esbranquiçada, tornando-se mais clara e menos abundante após a fase de nutriz (MICHENER, 1974). Larvas selecionadas pelas abelhas para criação de rainhas são alimentadas com secreções produzidas inteiramente pela glândula mandibular nos primeiros três dias de vida, seguido de dois dias de alimentação com secreções produzidas pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (proporção 1:1). Já, as larvas de operárias e zangões são alimentadas com secreções provenientes das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (proporção 3:1 a 4:1) (JUNG-HOFFMANN,

1966); e passam a receber a mistura de ambas as secreções com pólen e mel a partir do terceiro dia (HAYDAK, 1970). Embora produzida pelas mesmas glândulas, a geleia fornecida as larvas de abelhas operárias apresenta composição diferenciada e pode ser denominada como “geleia de operária” (HAYDAK, 1970; WANG et al., 2016). A geleia fornecida a operárias apresenta maior teor de umidade e de proteínas; e menores quantidades de açúcares (glicose e frutose) e de ácido trans-10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) em comparação a geleia fornecida a rainhas (WANG et al., 2016).

Dentre as abelhas de diferentes idades da colônia, as abelhas nutrizas apresentam a maior capacidade para digerir o pólen, devido à alta produção de enzimas proteolíticas que ocorre durante esse período (CRAILSHEIM et al., 1992). Dessa forma, a secreção produzida pelas glândulas mandibulares e hipofaringeanas é a principal forma de disponibilização de alimento rico em proteínas para todos os indivíduos da colônia (CRAILSHEIM, 1998). Essa secreção é responsável pela diferenciação de castas, sendo utilizada na nutrição de larvas, abelhas adultas, zangões e da rainha (MICHENER, 1974; CRAILSHEIM, 1998; PINTO et al., 2012). A geleia real é composta por água (50-60%), açúcares (15%), proteínas (18%), lipídeos (3-6%), minerais (1,5%), além de vitaminas e compostos bioativos, que incluem proteínas antimicrobianas, ácidos graxos e 10-HDA (NAGAI & INOUE, 2004).

As glândulas mandibulares são estruturas saculares pares encontradas em todos os himenópteros; nas abelhas *A. mellifera* essas glândulas são constituídas por um reservatório rodeado por células secretoras que formam um pseudoepitélio. A secreção da glândula é lançada por meio de um ducto diretamente para a base da mandíbula das abelhas (Figura 3). As glândulas mandibulares das abelhas nutrizas são responsáveis pela produção de secreção rica em 10-HDA, que é utilizada na alimentação das larvas no início do desenvolvimento. Além disso, essas glândulas também produzem pequenas quantidades de 2-heptanona (2HPT). A capacidade de produção de secreção nessa glândula pode ser avaliada pelo tamanho do reservatório e das células secretoras que a compõe (LANDIM, 2009). Alterações nessas glândulas devido à exposição de abelhas a agrotóxicos são pouco estudadas.

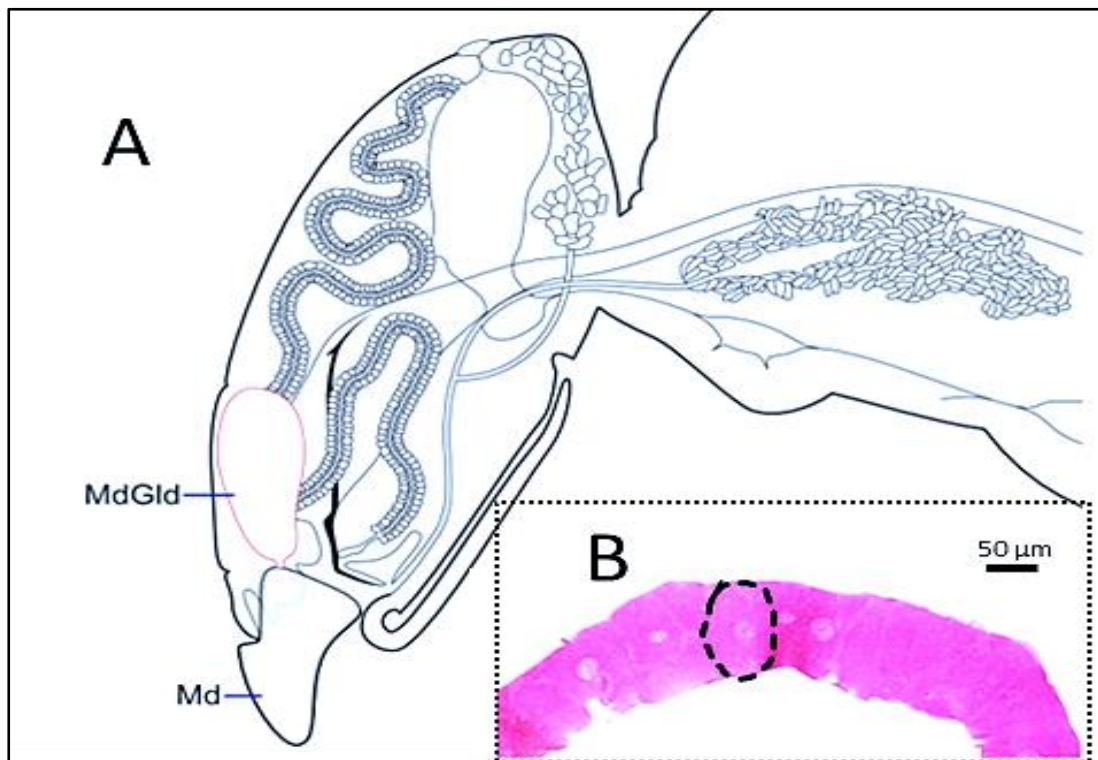


Figura 3. Glândula mandibular em *Apis mellifera*. (A) Esquema demonstrando a estrutura sacular da glândula mandibular (MdGld) e sua localização acima da mandíbula (Md) em vista lateral. (B) Células secretoras que formam o pseudoepitélío da glândula mandibular. Fontes: (A) <http://honeybee.drawwing.org/book/mandibular-glands-side-view>; (B) Zaluski, 2017.

As glândulas hipofaríngeas são estruturas pares, presentes em todos os himenópteros e são constituídas por centenas de células secretoras. Em *A. mellifera* essas glândulas são formadas por cachos de células secretoras de formato esférico (denominadas ácinos); os cachos podem alcançar 1 cm de comprimento e se enrolam sob o cérebro (Figura 4) (LANDIM, 2009).

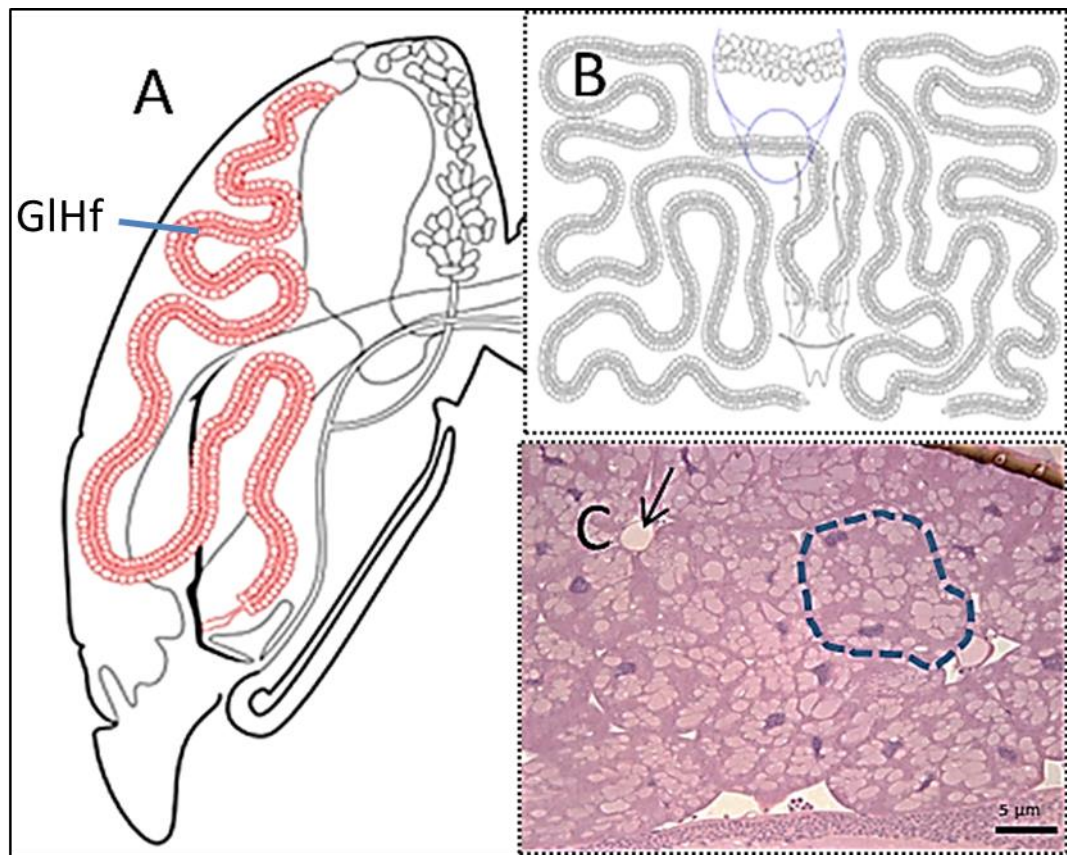


Figura 4. Glândula hipofaringeana em *Apis mellifera*. (A) Esquema demonstrando a localização da glândula hipofaringeana (GIHf) em vista lateral. (B) Esquema demonstrando ambas as glândulas hipofaringeanas presentes na cabeça das abelhas operárias. (C) Corte histológico demonstrando os ácinos (destaque pontilhado), o canal coletor de secreção (seta) e os grânulos de secreção proteica no interior dos ácinos. Fontes: (A,B) <http://honeybee.drawwing.org/book/hypopharyngeal-glands>; (C) Zaluski, 2017.

Deseyn e Billen (2005) verificaram que abelhas com idade de aproximadamente seis dias (nutrizes) apresentam essa glândula mais desenvolvida, quando comparada a abelhas com diferentes idades (0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 dias). Esses autores demonstraram também que a glândula hipofaringeana é pouco desenvolvida em abelhas recém-emergidas e exibe redução no tamanho dos ácinos em abelhas com mais de 15 dias de idade; e que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho dos ácinos. Após o pico de produção de geleia real as glândulas hipofaringeanas secretam enzimas como α -glicosidase, glucosidase oxidase, galactosidases, esterases, lipases e leucina arilamidases, envolvidas em processos de digestão e processamento do

néctar (HALBERSTADT, 1980; DESEYN & BILLEN, 2005). A redução da atividade de glândulas hipofaringeanas pode prejudicar o crescimento das larvas e afetar a manutenção da colônia (HEYLEN et al., 2011).

As abelhas nutrizas são altamente susceptíveis a exposição de agrotóxicos presentes em pólen contaminado, pois consomem até 65 mg de pólen nos primeiros 10 dias de sua vida (RORTAIS et al., 2005; HALM et al., 2006). Estudos realizados por Hatjina et al. (2013) verificaram que o desenvolvimento de glândulas hipofaringeanas em abelhas expostas a doses subletais do inseticida imidaclopride é prejudicado, demonstrando significativa redução no diâmetro dos ácinos dessas glândula. Heylen et al. (2011) demonstraram que abelhas com sete dias de idade expostas a xarope de açúcar contaminado com os inseticidas (Imidaclopride - 1 ppb; Indoxacarb - 300 ppb; ou Fenoxycarb - 100 ppm) ou com o fungicida Captan (120 ppm) por 24 horas, apresentaram redução no tamanho dos ácinos da glândula hipofaringeana quando essas abelhas possuíam 14 dias de idade. Smodiš Šker e Gregorc (2010) demonstraram que a exposição de abelhas de diferentes idades a xarope de açúcar contaminado com doses subletais dos inseticidas imidaclopride ou coumafós (por períodos de 1 a 3 dias) reduzem o tamanho dos ácinos da glândula hipofaringeana.

Considerando o papel das abelhas nutrizas para a manutenção das colônias, torna-se importante avaliar os impactos da sua exposição a doses ambientalmente relevantes do inseticida fipronil, fungicida piraclostrobina e suas associações. Até o presente momento, os estudos que avaliaram o desenvolvimento de glândulas hipofaringeanas trabalharam com a exposição de abelhas a alimento contaminado em condições de laboratório (HEYLEN et al., 2011; SMODIŠ ŠKER & GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013). Entretanto, avaliações das glândulas mandibulares e hipofaringeanas em abelhas nutrizas mantidas em colônias são mais apropriadas quando comparadas as avaliações realizadas com abelhas mantidas em laboratório, devido às interações que ocorrem na colônia e a liberação de feromônios pela cria que promovem completo desenvolvimento dessas glândulas em abelhas nutrizas (CRAILSHEIM & STOLBERG, 1989; LASS & CRAILSHEIM, 1996).

8. Proteômica e suas ferramentas de análise

As proteínas são as macromoléculas de maior importância para os organismos, devido a sua atuação direta em funções biológicas responsáveis pela manutenção da vida (ZHANG et al., 2013). O proteoma pode ser definido como a composição de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo; e é o objeto de estudo da proteômica (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). Os objetivos da proteômica são identificar e quantificar todas as proteínas de determinada amostra, englobando sua expressão, caracterização de modificações pós-traducionais, estudos de interações proteína-proteína e alterações em função do tempo (*turnover*); o que torna as investigações de um proteoma mais desafiadoras em comparação ao sequenciamento de um genoma (ZHANG et al., 2013).

A complexidade do proteoma se deve ao número de proteínas existentes em determinada amostra, as interações entre essas moléculas e sua estrutura tridimensional, que quando alteradas modificam sua função biológica (ALBERTS et al., 2002). O proteoma de um organismo sofre mudanças em função de alterações no ambiente, presença de substâncias tóxicas, condições patológicas, nos processos de desenvolvimento e diferenciação celular, entre outras condições (ALBERTS et al., 2002).

Estudos proteômicos em diversas áreas têm crescido de modo extraordinário devido ao desenvolvimento de estratégias no preparo das amostras que proporcionaram melhor separação de proteínas; avanços na área de espectrometria de massas para identificação de peptídeos; sequenciamento de genomas de diversas espécies, com a organização e sua disponibilização em bancos de dados; e avanços na área de bioinformática, permitindo integração e análise dos dados gerados por essas tecnologias (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

As duas principais técnicas para a análise qualitativa e quantitativa do proteoma são a eletroforese bidimensional (2D-PAGE; 2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) e espectrometria de massas (MORAES et al., 2013). A técnica 2D-PAGE para separação de proteínas se iniciou com estudos realizados por Stegeman (1970), combinando a isoeletrofocalização (IEF): etapa em que as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI); e a eletroforese em gel de poliacrilamida: etapa em que as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares (Mm). Em 1975, O'Farrell (1975) melhorou a resolução da técnica 2D-

PAGE, pela utilização de condições desnaturantes durante o preparo da amostra e a IEF. Com a introdução de gradientes de pH imobilizados durante a IEF, a técnica obteve reprodutibilidade suficiente para realização de análises proteômicas (BJELLQVIST et al., 1982).

As análises utilizando a técnica 2D-PAGE são baseadas em cinco etapas principais: preparo da amostra, primeira dimensão, segunda dimensão, detecção das proteínas, digitalização e tratamento das imagens (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). O preparo da amostra é fator essencial para adquirir resultados adequados no processo de separação das proteínas. As proteínas extraídas de uma amostra precisam ser encontradas em todos os géis (réplicas) sem perdas ou modificações; contaminações durante o processo de extração devem ser evitadas adotando boas práticas laboratoriais. Os procedimentos de extração das proteínas devem ser simples e rápidos, sempre garantindo a replicação dos procedimentos; e devem ser realizados na menor temperatura possível para evitar modificação/degradação das proteínas (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

O procedimento de extração, precipitação e solubilização das proteínas deve ser otimizado para cada tipo de amostra (ROCHA et al., 2005); e os processos de desnaturação, desagregação, redução e solubilização precisam garantir completo rompimento das interações moleculares para que cada *spot* (banda 2D de proteínas) no gel represente uma proteína (BERTH et al., 2007). Alguns compostos que incluem: proteínas muito abundantes, sais, proteases, lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos; podem prejudicar a solubilização e o processo eletroforético e devem ser removidos após a lise celular. Um dos procedimentos mais simples utilizados para remoção de interferentes das amostras é a precipitação das proteínas, utilizando acetato de amônio em metanol, acetona, ou ácido tricloroacético em acetona (GÖRG, WEISS & DUNN, 2004). Após a precipitação, a amostra é solubilizada em uma solução de reidratação e aplicada em fitas comerciais que contém géis com diferentes gradientes de pH; é importante que o processo de hidratação das proteínas nas fitas dure no mínimo 12h para garantir que as proteínas se difundam adequadamente. As fitas apresentam diferentes larguras (0,5 a 1,5 mm), comprimentos (7 a 24 cm) e gradientes de pH (3-10; 3-7; 3-12; 6-11; 6-9); esses fatores afetam a quantidade de proteínas que podem ser carregadas na fita, a resolução das proteínas na segunda dimensão e a faixa de pH das proteínas analisadas. A seleção de faixas de pH mais amplas permitem a visualização

geral das proteínas, enquanto faixas mais específicas de pH permitem separações mais específicas de proteínas, de acordo com o interesse do estudo (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

A primeira dimensão ou IEF é o processo onde as proteínas nas fitas com gradiente de pH são separadas em função de seu ponto isoelétrico (pI). As proteínas são submetidas a um campo elétrico e migram até encontrar uma faixa de pH em que sua carga é neutra (ponto isoelétrico) (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). Após esse processo é fundamental que as fitas sejam equilibradas em duas etapas com soluções contendo o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), para que possam então ser separadas de acordo com sua massa molecular. O SDS é um detergente que apresenta uma cadeia apolar longa ligada a um grupo terminal carregado; possui ação desnaturante que rompe interações hidrofóbicas responsáveis por manter a estrutura proteica nativa e confere carga negativa as proteínas. Na primeira etapa a solução de equilíbrio contém ditioneína (DTT), responsável por manter as proteínas em sua forma reduzida; na segunda etapa é utilizada iodoacetamida (IAA) para alquilação dos grupos tióis das proteínas e prevenção da sua reoxidação; permitindo assim sua completa interação com o SDS (GÖRG, WEISS & DUNN, 2004).

Na segunda dimensão do processo em que as proteínas são separadas com base em sua massa molecular é utilizado o gel de poliacrilamida com SDS. A mobilidade das proteínas no gel é dependente do tamanho dos poros do gel e da Mm das proteínas. O percentual de acrilamida do gel é que determina o tamanho dos poros; se o objetivo do estudo é identificar proteínas com alta Mm, um gel com concentração mais baixa (10% por exemplo) deve ser selecionado; se proteínas de baixa Mm são o alvo do estudo, um gel mais concentrado deve ser utilizado (15% por exemplo) (ANDREWS, 1998). As fitas contendo as proteínas separadas em função do pI são posicionadas sobre o gel de acrilamida, lateralmente é adicionado um papel filtro contendo um padrão de proteínas com conhecida massa molecular; as fitas são seladas com uma solução de agarose e submetidas a um campo elétrico para a migração das proteínas no gel (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Para a visualização das proteínas no gel é realizada sua coloração, geralmente utilizando o corante azul brilhante de Coomassie ou nitrato de prata. Como resultado, obtém-se no gel os *spots* proteicos, pontos que correspondem a coordenada ortogonal em

que determinada proteína migrou em função do pI e da Mm (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). A coloração por nitrato de prata é mais sensível, entretanto, o Coomassie é mais utilizado em estudos para subsequente identificação de proteínas por espectrometria de massas, pois permite melhor quantificação da abundância relativa de cada proteína no gel (SCHLEICHER & WATTERSON, 1983; WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Um dos principais objetivos da proteômica é identificar diferenças na expressão de proteínas entre amostras provenientes de grupos experimentais e controles, usando uma série de géis para cada tratamento. Os *spots* contendo as proteínas podem ser inibidos (desaparecer), induzidos (aparecer), assim como podem ocorrer alterações em sua abundância (aumento ou redução de sua intensidade) (GÖRG, WEISS & DUNN, 2004). Para a realização dessas análises, após a coloração, são utilizados scanners específicos que digitalizam os géis para obtenção da intensidade específica de cada *spot* (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). Com a utilização de softwares específicos obtém-se o número, valores de pI, Mm e volume dos *spots* presentes em cada gel, obtido de uma série de corridas eletroforéticas. Ao comparar géis de grupos experimentais e controle é possível analisar a expressão individual dos *spots* proteicos desses grupos, utilizando testes estatísticos que indicam diferenças, similaridades e variações específicas entre os grupos experimentais (RABILLOUD & LELONG, 2011).

Após a análise dos *spots* é necessário seu processamento para a identificação das proteínas; esse processo envolve a excisão dos *spots* de interesse dos géis, descoloração, redução e alquilação das proteínas, digestão trípica e eluição dos peptídeos, possibilitando sua identificação por espectrometria de massas (MS). Esses procedimentos são descritos em detalhes por Shevchenko et al. (2006).

A espectrometria de massas no campo da proteômica é uma ferramenta analítica capaz de quantificar e determinar a sequência de aminoácidos dos peptídeos, visando à identificação das proteínas que constituem a amostra. As análises permitem identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de moléculas e as modificações pós-traducionais, como metilação, glicosilação, acetilação e fosforilação. O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização (responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra), um analisador de massas (determina a relação massa/carga -

m/z do analito) e um detector de íons (detecta a presença do analito) (STEEN & MANN, 2004; MORAES, et al., 2013).

As duas principais fontes de ionização utilizadas na análise de peptídeos são: ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) e ionização por Eletrospray (ESI – Eletrospray Ionization). Geralmente, estas fontes podem ser combinadas de diferentes formas com os analisadores permitindo a construção de equipamentos híbridos de alto desempenho. O uso da fonte de ionização MALDI com dois analisadores TOF (Time of Flight) em tandem (alinhados) e da fonte ionização por ESI-MS MS (espectrometria de massas em sequência com ionização por eletrospray) vem sendo utilizada em diversos estudos para análise de peptídeos (NYMAN, 2001; MORAES et al., 2013).

Na ionização por MALDI a amostra é misturada a uma matriz orgânica e aplicada em uma placa de aço inoxidável contendo microfissuras. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam, ocorre sua co-cristalização. A placa então é submetida a jactos de laser, o que provoca a fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra, e posterior desorção, fazendo com que os íons do analito entrem em fase gasosa. Após entrarem em fase gasosa, os analitos são encaminhados ao analisador do tipo TOF, onde os íons são acelerados pela aplicação de uma diferença de potencial e percorrem um espaço livre (tubo de vôo) sob vácuo, até serem detectados. Os íons de m/z diferentes atingem o detector em tempos diferentes, sendo que os íons de maior massa levam mais tempo para atingir o detector (MORAES et al., 2013).

Na ESI-MS MS os peptídeos gerados pela digestão trípica são injetados no espectrômetro de massas utilizando colunas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acopladas diretamente ou “*on line*” ao equipamento. Os peptídeos são eluídos das colunas por um gradiente de solvente de acordo com sua hidrofobicidade (STEEN & MANN, 2004). A ESI é uma técnica relativamente simples e branda em que os íons formados possuem baixa energia interna, permitindo a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. Esta técnica é eficaz na análise de moléculas grandes não voláteis e que podem adquirir cargas (proteínas e ácidos nucleicos) (GROSS, 2011). Os peptídeos são eluídos da coluna de cromatografia e dispersos eletrostaticamente em gotículas líquidas altamente carregadas, que em experimentos de proteômica são normalmente carregadas positivamente, devido a um

excesso de prótons. Uma vez que as gotículas estão em suspensão no ar, o solvente evapora ocasionando a redução do tamanho das gotículas e aumento da sua densidade de carga. Os íons são dessolvatados pela sua dessorção a partir da superfície da gota devido ao elevado campo elétrico e/ou a formação de gotículas muito pequenas que são geradas devido à repetida fissão das gotículas; isso resulta em gotículas que contém em média apenas um íon do analito por gota. Após a ionização, um espectro de massas é gerado e ocorre o registro da intensidade do sinal do íon para cada valor na escala m/z (dado em Daltons – Da por carga) (STEEN & MANN, 2004)

Finalmente os dados de sequenciamento dos peptídeos são confrontados com bancos de dados (que contem dados de fragmentação teóricos de proteínas, gerados *in silico*) utilizando softwares como Mascot ou Sequest. Estes softwares apresentam os resultados encontrados na forma de estimadores da confiabilidade de identificação; quanto maior o valor do estimador, menor é a probabilidade do resultado ser uma identificação falso-positiva (MORAES et al., 2013).

9. Utilização de ferramentas proteômicas (2D-PAGE) para estudos em abelhas

Os estudos proteômicos em abelhas utilizando análises 2D-PAGE têm se concentrado em investigações do desenvolvimento desses insetos (LI et al., 2010, 2011; WOLTEDI et al., 2013); incluindo análises em diferentes condições ambientais (ERBAN, JEDELSKY & TITERA, 2013) e diferentes condições da colônia (CARDOEN et al., 2011). Alguns estudos analisaram o proteoma do cérebro (GARCIA et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2012); o desenvolvimento de glândulas hipofaríngeas (FENG, FANG & LI, 2009; SANTOS et al., 2005); e de proteínas da geleia real (LI et al., 2007; FURUSAWA et al., 2008; FANG, FENG, & LI, 2010).

Entretanto, estudos proteômicos que avaliaram alterações em abelhas expostas a agrotóxicos são escassos na literatura. Roat et al. (2014) identificaram alterações na expressão de proteínas em abelhas expostas por ingestão a 10 pg de fipronil durante 5 dias; foram identificadas 25 e 15 proteínas diferentemente expressas em abelhas recém-emergidas e com 20 dias de idade, respectivamente. A exposição das abelhas ao inseticida alterou a expressão de proteínas relacionadas à susceptibilidade a patógenos,

estresse, apoptose, aprendizagem visual, formação de sinapses, degeneração neural, memória e aprendizado.

A análise de alterações fisiológicas e metabólicas em abelhas expostas a doses ambientalmente relevantes de agrotóxicos se torna importante para avaliação dos riscos que algumas moléculas amplamente utilizadas representam para manutenção de suas colônias. É importante destacar também que as abelhas melíferas são insetos indicadores para a avaliação dos riscos que agrotóxicos representam para outros polinizadores, incluindo abelhas nativas. Dessa forma, esses estudos podem contribuir para discussão dos níveis de segurança para aplicação de ingredientes ativos de agrotóxicos em cultivos visitados pelas abelhas e para adoção de estratégias que visem reduzir a exposição das abelhas a moléculas que podem comprometer sua manutenção.

10. Justificativa

As abelhas são importantes polinizadores que contribuem para a manutenção de ecossistemas e produção de alimentos; além de possibilitarem a exploração de produtos apícolas garantindo a geração de emprego e renda a milhares de apicultores. Apesar de sua importância, reduções significativas de colônias de abelhas melíferas vêm ocorrendo mundialmente. As abelhas são expostas a agrotóxicos durante a coleta de recursos, sendo frequentes as detecções de inseticidas e fungicidas sistêmicos em produtos da colônia, gerando discussões sobre os impactos que essas exposições ocasionam para a manutenção das colônias. Diante deste cenário é importante avaliar os efeitos da exposição crônica de abelhas melíferas a doses ambientalmente relevantes de inseticidas e fungicidas, isoladamente e em associação. Considerando que as abelhas nutrizas desempenham funções estratégicas na colônia, estudos de potenciais alterações em processos fisiológicos e metabólicos nessas abelhas são fundamentais para melhor compreensão dos efeitos da exposição desses polinizadores a agrotóxicos. Estudos da morfologia de glândulas mandibulares e hipofaringeanas em abelhas nutrizas se tornam fundamentais, uma vez que alterações morfológicas nessas estruturas podem afetar a quantidade e qualidade da geleia real, prejudicando o desenvolvimento e manutenção das colônias. Adicionalmente, as ferramentas proteômicas podem demonstrar alterações qualitativas e quantitativas em proteínas, e apresentam grande potencial para identificação e análise de vias metabólicas alteradas pela exposição das abelhas a agrotóxicos. Dessa forma, análises morfológicas e proteômicas podem contribuir para maior entendimento dos impactos da exposição das abelhas nutrizas a agrotóxicos, auxiliando na detecção de efeitos crônicos que podem comprometer a manutenção de suas colônias.

11. Hipóteses, objetivos e publicações

A exposição de abelhas nutrizas ao inseticida fipronil e ao fungicida piraclostrobina, de forma isolada e em associação, ocasiona alterações morfológicas em glândulas mandibulares e hipofaríngeas; e ocasiona modificações na expressão de proteínas que são essenciais para sua manutenção.

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar alterações na morfologia de glândulas mandibulares e hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* Africanizadas nutrizas expostas à dieta contendo pólen polifloral contaminado com o inseticida fipronil, fungicida piraclostrobina e associação de fipronil e piraclostrobina, em condição de campo; e avaliar alterações no proteoma da cabeça de abelhas nutrizas expostas a essas moléculas.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar por meio de análises histológicas, a altura das células secretoras e o volume do reservatório de glândulas mandibulares.
- Avaliar por meio de análises histológicas, o número total de ácinos e o tamanho dos ácinos das glândulas hipofaríngeas.
- Avaliar alterações no proteoma da cabeça de abelhas nutrizas utilizando a técnica 2D-PAGE.
- Identificar as proteínas com diferença de expressão por ESI-MS/MS.
- Analisar e discutir as principais alterações no metabolismo das abelhas expostas aos agrotóxicos, com base na função das proteínas identificadas.

A presente pesquisa resultou em dois artigos que serão submetidos à revista *Scientific Reports*, conforme as suas normas de publicação:

“Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*)”.

“Alterações no proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* nutrizas expostas a doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina e inseticida fipronil”.

12. Referências

AIZEN, M. A.; MORALES, C. L.; MORALES, J. M. Invasive mutualists erode native pollination webs. **PLoS Biol.**, v. 6, p. e31, 2008.

AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdiscip. Toxicol.** v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. 1616 p.

AMDAM, G. V.; PAGE JR., R. E. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Anim. Behav.**, v. 79, n. 5, p. 973-980, 2010.

ANDERSON, K. E. et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Soc.**, v. 58, p. 431-444, 2011.

ANDREWS, A. T. Peptide mapping. In: HAMES, B. D. (Ed.). **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1998. p. 213-233.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Can. J. Bot.**, v. 73, n. S1, p. 940-945, 1995.

ARNOULT, D. et al. The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. **Semin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 223-232, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE MEL. **Setor apícola brasileiro em números**. 2017. Disponível em: <http://brazilltsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_dezembro_2016.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2017.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **J. Exp. Biol.**, v. 218, p. 2799-2805, 2015.

BARTOMEUS, I. et al. Historical changes in northeastern US bee pollinators related to shared ecological traits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 12, p. 4656-4660, 2013.

BASF, THE CHEMICAL COMPANY. **Inseticides**: regent 800 WG, Brazil, Basf. 2017a. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/insecticides/insecticides_product/Regente_800_WG>. Acesso em: 17 mar. 2017.

BASF, THE CHEMICAL COMPANY. **Ficha de informação de segurança de produto químico**: comet, Brazil, Basf. 2017b. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazil/solutions/fungicides/FISPQ/FISPQ_-_COMET.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2017.

BEEKMAN, M.; RATNIEKS, F. L. W. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. **Funct. Ecol.**, v. 14, n. 4, p. 490-496, 2000.

BERNADOU, A. et al. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. **J. Insect Physiol.**, v. 55, p. 1099-1106, 2009.

BERTH, M. et al. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 76, p. 1223-1243, 2007.

BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.

BIRD, S. L.; ESTERLY, D. M.; PERRY, S. G. Off-target deposition of pesticides from agricultural aerial spray applications. **J. Environ. Qual.**, v. 25, n. 5, p. 1095-1104, 1996.

BJELLQVIST, B. et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982.

BONMATIN, J. M. et al. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 9, p. 2027-2033, 2003.

BOTÍAS, C. et al. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. **Environ. Sci. Technol.**, v. 49, p. 12731-12740, 2015.

BOVI, T. S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R. O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 2017. No prelo.

BRASIL. Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (Lei Federal dos agrotóxicos). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 Jan. 2002. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Comunicado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 Jul. 2012. Seção 3, n. 139, p. 112.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 28 de dezembro de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 Jan. 2013. Seção 1, n. 3, p. 10.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**: Agrofit. Brasília, 2017a. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 24 mar. 2017.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 Fev. 2017b. Seção 1, n. 30, p. 33.

CARDOEN, D. et al. Differential proteomics in dequeened honeybee colonies reveals lower viral load in hemolymph of fertile worker bees. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20043, 2011.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Gaia, 2010. 327 p.

CHAUZAT, M. P. et al. A survey of pesticide residues in pollen loads by honeybees in France. **J. Econ. Entomol.**, v. 99, n. 2, p. 253-262, 2006.

CLUZEAU, S. Risk assessment of plant protection products on honey bees: regulatory aspects. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÉGUE, M-H. (Org.). **Honey bees**: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor & Francis, 2002. p. 46-59.

COSTA, L. M. et al. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 578-582, 2015.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, p. 283-286, 2007.

CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. **J. Comp. Physiol. B**, v. 162, p. 681-689, 1992.

CRAILSHEIM, K. et al. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. **J. Insect Physiol.**, v. 38, n. 6, p. 409-419, 1992.

CRAILSHEIM, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 29, n. 1-2, p. 97-112, 1998.

CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **J. Insect Physiol.**, v. 35, p. 595-602, 1989.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. London: Taylor & Francis, 1999. 682p.

CUNHA, J. **Mortandade disseminada das abelhas devido ao uso de agrotóxicos**. Brasília, DF: Câmara de Deputados, 2013. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/4-7-2013-mortandade-disseminada-das-abelhas-devido-ao-uso-de-agrotoxicos/apresentacoes>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

DAI, P-L. et al. The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). **Apidologie**, v. 43, n. 4, p. 384-391, 2012.

DAMALAS, C. A. Pesticide drift: seeking reliable environmental indicators of exposure assessment. In: ARMON, R. H.; HÄNNINEN, O. (Ed.). **Environmental indicators**. Netherlands: Springer, 2015. p. 251-261.

DANFORTH, B. Bees - a primer. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 5, p. R156-R161, 2007.

DAVID, A. et al. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 407, p. 8151-8162, 2015.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; SIMONDS, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v. 4, p. 71-89, 2013.

DEL LAMA, M. A. et al. Clinical variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas**, v. 140, p. 149-153, 2004.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v. 36, p. 49-57, 2005.

DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J; PHAM-DELÉGUE, M-H. (Orgs.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 56-66.

DORNELLES, M. E. et al. Inspeção técnica de pulverizadores agrícolas: histórico e importância. **Cienc. Rural**, v. 39, n. 5, p. 1601-1606, 2009.

ELLIS, J. The honey bee crisis. **Outlooks Pest Manag.**, v. 23, p. 35-40, 2012.

ENGEL, P.; MARTINSON, V. G.; MORAN, N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 27, p. 11002-11007, 2012.

ERBAN, T.; JEDELSKY, P. L.; TITERA, D. Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 404-418, 2013.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J-M. Precise assessment of the number of patrines and of genetic relatedness in honey bee colonies. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 258, p. 1-7, 1994.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Modification of the existing MRLs for pyraclostrobin in tomatoes, aubergines, globe artichokes and celeriac. **EFSA J.**, v. 8-6, n. 1630, p. 1-26, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EFSA Guidance document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). **EFSA J.**, v. 11-7, n. 3295, 2013a.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. **EFSA J.**, v. 11-5, n. 3158, p. 1-51, 2013b.

FANG, Y.; FENG, M.; LI, J. K. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 5, p. 2207-2215, 2010.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, v. 10, n. 645, p. 1-12, 2009.

FRANCK, P. et al. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**, v. 86, p. 420-430, 2001.

FRAZIER, M. T. et al. Assessing honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging populations and the potential impact of pesticides on eight U.S. crops. **J. Econ. Entomol.**, v. 108, n. 5, p. 2141-2152, 2015.

FRIES, I. Evaluation of Varroa mite tolerance in honey bees. In: SAMMATARO, D.; YODER, J. A. (Ed.). **Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions**. New York: CRC Press, 2011. p. 21-24.

FURUSAWA, T. et al. Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 8, p. 3194-3229, 2008.

GARCIA, L. et al. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 3, p. 1464-1473, 2009.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 35, p. 419-430, 2004.

GARRIDO-BAILÓN, E. et al. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Exp. Parasitol.**, v. 132, n. 4, p. 530-536, 2012.

GHISI, N. C. et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with fipronil. **Environ. Monit. Assess.**, v. 180, n. 1-4, p. 589-599, 2011.

GIROLAMI, V. et al. Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. **J. Appl. Entomol.**, v. 136, n. 1-2, p. 17-26, 2011.

GIROLAMI, V. et al. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. **J. Econ. Entomol.**, v. 102, n. 5, p. 1808-1815, 2009.

GONÇALVES, L. S. Africanized honey bee: introduction, adaptation and benefits. In: INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS, 37, 2001, Durban. **Proceedings...** Durban, 2001. p. 1-3.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.

GREATTI, M. et al. Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds. **Bull. Insectology**, v. 59, n. 2, p. 99-103, 2006.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**: a textbook. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2011. 753 p.

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T. **Environmental fate of fipronil**. Sacramento: California Environmental Protection Agency, 2007.

GUPTA, R. K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: GUPTA, R. K. et al. (Ed.). **Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security**. Netherlands: Springer, 2014. p. 63-103.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 23, p. 12764-12767, 1996.

HALBERSTADT, K. Elektrophoretische untersuchungen zur sekretionstätigkeit der hypopharynxdrüse der honigbiene *Apis mellifera* L. **Insectes Soc.**, v. 27, n. 1, p. 61-77, 1980.

HALD, A. B. Weed vegetation (wild flora) of long established organic versus conventional cereal fields in Denmark. **Ann. Appl. Biol.**, v. 134, p. 307-314, 1999.

HALM, M. P. et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, n. 7, p. 2448-2454, 2006.

HAN, F.; WALLBERG, A.; WEBSTER, M. T. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? **Ecol. Evol.**, v. 2, n. 8, p. 1949-1957, 2012.

HANLEY, N. et al. Measuring the economic value of pollination services: principles, evidence and knowledge gaps. **Ecosyst. Serv.**, v. 14, p. 124-132, 2015.

HATJINA, F. et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 467-480, 2013.

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 15, p. 143-156, 1970.

HENDRIKSMA, H. P. et al. Effect of stacked insecticidal cry proteins from maize pollen on nurse bees (*Apis mellifera carnica*) and their gut bacteria. **PLoS One** v. 8, n. 3, p. e59589, 2013.

HERNÁNDEZ, L. G. et al. The worker honeybee brain proteome. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 3, p. 1485-1493, 2012.

HEYLEN, H. et al. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 103-116, 2011.

HIGES, M. et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environ. Microbiol.**, v. 10, n. 10, p. 2659-2669, 2008.

HOOD, W. M. The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. **Bee World**, v. 85, n. 3, p. 51-59, 2015.

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **J. Insect Physiol.**, v. 44, n. 10, p. 929-939, 1998.

HU, S. et al. Early steps of angiosperm pollinator coevolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 1, p. 240-245, 2008.

HYVONEN, T.; SALONEN, J. Weed species diversity and community composition in cropping practices at two intensity levels – a six-year experiment. **Plant Ecol.**, v. 159, n. 1, p. 73-81, 2002.

IVIC, D. Curative and Eradicative Effects of Fungicides, Fungicides. In: CARISSE, O. (Ed.). **Fungicides**. Rijeka (Croatia): InTech, 2010. p. 1-22.

IWASA T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Prot.**, v. 23, p.371-378, 2004.

JOHNSON, R. M. Honey bee toxicology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 60, p. 415-434, 2015.

JOHNSON, R. M.; PERCEL, E. G. Effect of a fungicide and spray adjuvant on queen-rearing success in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 106, n. 5, p. 1952-1957, 2013.

JOHNSON, R. M. et al. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54092, 2013.

JUNG-HOFFMANN, I. Die determination von königin und arbeitlerin der honigbiene. **Z. Bienenforsch.**, v. 8, p. 296-322, 1966.

KERR, W. E. The history of the introduction of Africanized bees to Brazil. **S. Afr. Bee J.**, v. 39, p. 3-5, 1967.

KERR, W. E.; DEL RIO, S. L.; BARRIONUEVO, M. D. The southern limits of the distribution of the africanized honey bees in South America. **Am. Bee J.**, v. 122, p. 196-198, 1982.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proc. Biol. Sci.**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KREMEN, C. et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecol. Lett.**, v. 10, p. 299-314, 2007.

KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29268, 2012.

LANDIM, C. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 408 p.

LASS, A.; CRAILSHEIM, K. Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insectes Soc.**, v. 43, p. 347-358, 1996.

LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Rev. Sci. Tech.**, v. 27, n. 2, p. 499-510, 2008.

LEBUHN, G. et al. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. **Conserv. Biol.**, v. 27, p. 113-120, 2013.

LEE, K. V. et al. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie**, v. 46, p. 292-305, 2015.

LI, J. et al. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 21, p. 8411-8422, 2007.

LI, J. et al. Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13455, 2010.

LI, J. et al. Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) drone embryo proteomes. **J. Insect Physiol.**, v. 57, n. 3, p. 372-384, 2011.

LIVANIS, G.; MOSS, C. B. The effect of Africanized honey bees on honey production in the United States: an informational approach. **Ecol. Econom.**, v. 69, n. 4, p. 895-904, 2010.

LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nat. Commun.**, v. 7, n. 11629, p. 1-12, 2016.

LOURENÇO, C. T. et al. Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Pest Manag. Sci.**, v. 71, n. 8, p. 1049-1053, 2015.

MALONE, L. A.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Using proteins to assess the potential impacts of genetically modified plants on honey bees. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÉGUE, M-H. (Org.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 290-311.

MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **J. Apic. Res.**, v. 38, n. 3, p. 191-197, 1999.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard University Press, 1974. 404 p.

MORAES, C. S. et al. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro: IOC, 2013. 84 p.

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 16, n. 1, p. 71-77, 1993.

MULLIN, C. A. et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environ. Entomol.**, v. 33, n. 5, p. 1151-1154, 2004.

NAGAI, T.; INOUE, R. Preparation and functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food Chem.**, v. 84, p. 181-186, 2004.

NARAHASHI, T. et al. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 97, p. 149-152, 2010.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **J. Apic. Res.**, v.49, n.1, p. 1-6, 2010.

NICODEMO, D. et al. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 33, n. 9, p.2070-2075, 2014.

NOGUEIRA NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J. M. F. (Ed.). **Manual de apicultura**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 1972. p. 17-32.

NUNES-SILVA, P. et al. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 23, n. 3-4, p. 325-332, 2006.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomol. Eng.**, v. 18, n. 5, p. 221-227, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **PLoS Biol.**, v. 5, n. 6, p. e168, 2007.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

PAGE JR., R.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp. Gerontol.**, v. 36, n. 4, p. 695-711, 2001.

PAINI, D. R. Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) on native bees: A review. **Austral. Ecol.**, v. 29, p. 399-407, 2004.

PAREJA, L. et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.

PARKER, R. et al. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11096, 2010.

PAUDEL, Y. P. et al. Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: current status, impacts and potential drivers of decline. **J. Agric. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 93-109, 2015.

PESTICIDE ACTION NETWORK. **Pesticide Database**. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org/Docs/data.html#Overview>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. S. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. **Apidologie**, v. 41, p. 256-263, 2010.

PETTIS, J. S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.

PHAM-DELÈGUE, M. H.; JOUANIN, L.; SANDOZ, J. C. Direct and indirect effects of genetically modified plants on the honey bee. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M-H. (Org.). **Honey bees**: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor & Francis, 2002. p. 313-326.

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **J. Agric. Environ. Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17-29, 1995.

PINTO, F. A. et al. Nutritional and temporal effects on hypopharyngeal glands of africanized honeybees (Hymenoptera – Apidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 2, p. 447-456, 2012.

PINTO, M. A. et al. Africanization in the United States: replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. **Genetics**, v. 170, n. 4, p. 1653-1665, 2005.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 22, p. 68-102, 2015.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends Ecol. Evol.**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **J. Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.

RADLOFF, S. E.; HEPBURN, H. R.; ENGEL, M. S. The Asian species of *Apis*. In: HEPBURN, H. R.; RADLOFF, S. E. (Ed.). **Honeybees of Asia**. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2011. p. 1-22.

RAMIREZ-ROMERO R. et al. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 70, p. 327-333, 2008.

RAVOET, J. et al. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72443, 2013.

RENZI, M. T. **Effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.):** study of a specific route of exposure and evaluation of biochemical-physiological changes in the assessment of the pesticides toxicity. 2013. 97 f. Tese (Doutorado) - Université D Avignon, Universita Degli Studi, Bolonha, Itália, 2013.

RINDERER, T. E. et al. Male reproductive parasitism: a factor in the Africanization of European honey-bee populations. **Science**, v. 228, p. 1119-1121, 1985a.

RINDERER, T. E. et al. A comparison of Africanized and European drones: weights, mucus gland and seminal vesicle weights, and counts of spermatozoa. **Apidologie**, v. 16, n. 4, p. 407-412, 1985b.

RINDERER, T. E. et al. Differential drone production by Africanized and European honey bee colonies. **Apidologie**, v. 18, n. 1, p. 61-68, 1987.

RINDERER, T. E. et al. Comparative nest architecture of the dwarf honey bees. **J. Apic. Res.**, v. 35, n. 1, p. 19-26, 1996.

ROAT, T. C. et al. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1659-1670, 2014.

ROBIN, F. A.; MORITZ, S. H.; NEUMANN, P. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. **Ecoscience**, v. 12, n. 3, p. 289-301, 2005.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 1-12. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/187102/eletroforese-bidimensional-e-analise-de-proteomas>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.

RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Berlin: Springer, 1988. 284 p.

SACCONE, C.; LANAVE, C.; DE GRASSI, A. Metazoan OXPHOS gene families: evolutionary forces at the level of mitochondrial and nuclear genomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1171-1178, 2006.

SAMSON-ROBERT, O. et al. Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e108443, 2014.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - a risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.

SANTOS, G. M. M. et al. Invasive Africanized honeybees change the structure of native pollination networks in Brazil. **Biol. Invasions**, v. 14, p. 2369-2378, 2012.

SANTOS, K. S. et al. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, n. 1, p. 85-91, 2005.

SARTO, M. et al. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 626-636, 2014.

SCHLEICHER, M.; WATTERSON, D. M. Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: Conditions for the detection of calmodulin and troponin C. **Anal. Biochem.**, v. 131, n. 2, p. 312-317, 1983.

SEELEY, T. D. **The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies.** London: Harvard University Press, 1995. 295 p.

SHEPPARD, W. S. et al. Gene flow between African and European derived honey bee populations in Argentina. **Nature**, v. 349, p. 782-784, 1991.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.

SMODIŠ ŠKER, M. I.; GREGORC, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v. 41, n. 1, p. 73-86, 2010.

SMODIŠ ŠKER, M. I. et al. Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.83, n.3, p.374-377, 2009.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the honeybee.** Ithaca: Cornell University Press, 1956. 315 p.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The origin and diversification of angiosperms. **Am. J. Bot.**, v. 91, n. 10, p. 1614-1626, 2004.

SPIEGEL, J.; STAMMLER, G. Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. **J. Plant Dis. Protect.**, v. 113, n. 5, p. 199-206, 2006.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STEGEMANN, H. Proteinfraktionierungen in polyacrylamid und die anwendung auf die genetische analyse bei pflanzen. **Angew. Chem.**, v. 82, n. 15, p. 640-640, 1970.

STEINHAEUER, N. A. et al. A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the bee informed partnership. **J. Apic. Res.**, v. 53, n. 1, p. 1-18, 2014.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A africanização das abelhas “*Apis mellifera*” nas Américas – I. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 33-47.

STOUT, J. C.; MORALES, C. L. Ecological impacts of invasive alien species on bees. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 388-409, 2009.

TANNER, G.; CZERWENKA, C. LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 23, p. 12271-12277, 2011.

TAYLOR, J. R. The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. **Bee World**, v. 58, n. 1, p. 19-30, 1977.

VAN ENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.

VAN VEEN, J. W. Biology of honeybees and stingless bees. In: GUPTA, R. K. et al. (Ed.). **Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security**. Netherlands: Springer, 2014. p. 105-123.

WANG, Y. et al. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 47, p.48-56, 2016.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomic in practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim: Wiley VCH Verlag, 2002. 329 p.

WHITFIELD, C. W. et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. **Science**, v. 314, n. 5799, p. 642-645, 2006.

WILMS, W.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ENGELS, W. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Stud. Neotrop. Fauna Environ.**, v. 31, p. 137-151, 1996.

WILSON, E. **Sociobiology**: the new synthesis. Belknap Press: Harvard University Press, 2000. 720 p.

WINSTON, M. L. Swarming, after swarming, and reproductive rate of unmanaged honeybee colonies (*Apis mellifera*). **Insectes Soc.**, v. 27, p. 391-398, 1980.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Tradução: OSOWSKI, C. A. Porto Alegre: Magistre, 2003. 276 p.

WOLTEDJI, D. et al. Proteome analysis of hemolymph changes during the larval to pupal development stages of honeybee workers (*Apis mellifera ligustica*). **J. Proteome Res.**, v. 12, n. 11, p. 5189-5198, 2013.

WORRALL, S. **How will we feed a world of nine billion people?** National Geographic, 2015. Disponível em: <<http://news.nationalgeographic.com/2015/07/150701-hunger-food-agriculture-population-ngbooktalk/>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

YANG, C. et al. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecol.**, v. 2011, n. 130289, p. 1-8, 2011.

YODER, J. A. et al. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 76, n. 10, p. 587-600, 2013.

ZALUSKI, R. et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 34, n. 5, p. 1062-1069, 2015.

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem. Rev.**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.

ZHAO, X. et al. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHU, W. et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.

CAPÍTULO II

Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*)

Abstract

Global decreases in bee populations emphasize the importance of assessing how environmental stressors affect colony maintenance, especially considering the extreme task specialization observed in honeybee societies. Royal jelly, a protein secretion essential to colony nutrition, is produced by nurse honeybees, and development of bee mandibular glands, which comprise a reservoir surrounded by secretory cells and hypopharyngeal glands that are shaped by acini, is directly associated with production of this secretion. Here, we examined individual and combined effects of the systemic fungicide pyraclostrobin and insecticide fipronil in field-relevant doses (850 and 2.5 ppb, respectively) on mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees. Six days of pesticide treatment decreased secretory cell height in mandibular glands. When pyraclostrobin and fipronil were combined, the reservoir volume in mandibular glands also decreased. The total number of acini in hypopharyngeal glands was not affected, but pesticide exposure reduced the number of larger acini while increasing smaller acini. These morphological impairments appeared to reduce royal jelly secretion by nurse honeybees and consequently hampered colony maintenance. Overall, pesticide exposure in doses close to those experienced by bees in the field impaired brood-food glands in nurse honeybees, a change that could negatively influence development, survival, and colony maintenance.

Introduction

Pollination is an indispensable process that ensures ecosystem maintenance, plant reproduction, agriculture, and food security¹. Approximately 35% of globally important food crops depend on pollinators². Among the most common are honeybees (*Apis mellifera* L.), managed worldwide for pollination services^{1,2} and which generate considerable revenue in the beekeeping industry through their production of honey, pollen, propolis, beeswax, royal jelly, and apitoxin.

Despite the importance of honeybees and other pollinators, their global populations have seen major reductions^{1,3-5}. The main factors responsible are anthropogenic actions that reduce and fragment pollinator habitat, affecting resource availability, the spread of diseases and parasites, and invasive species as well as pesticide exposure. These factors can act alone or synergistically to impair pollinator maintenance^{5,6}.

In particular, existing concerns about pesticide exposure to non-target organisms have raised questions regarding whether field-relevant doses are harmful to honeybees⁷⁻⁹. High pesticide concentrations can immediately kill off colonies¹⁰, while chronic exposure to sub-lethal doses, which occurs frequently^{3,10-12}, may have delayed negative effects¹³. These sub-lethal effects include compromised resource collection; behavioural changes; decreased longevity, immune function, population growth, reproduction, and learning performance; and the creation of new queens, thus, ultimately influencing colony survival^{5,13-21}. Specifically, pesticide or xenobiotic exposure is linked to midgut-cell impairment²²⁻²⁶ that can reduce nutrient digestion and absorption in insects^{27,28} and potentially damage honeybee physiology.

Insecticides are often related to honeybee losses because of their high toxicity and lack of specificity^{15,20,29}. However, pollinators are more likely to encounter fungicides during foraging¹³. Because fungicides are traditionally considered safe to pollinators, they can be applied on blooming crops, increasing non-target exposure^{13,30} and are becoming the most commonly found pesticide in bee colony combs and food stores^{11,31}. However, studies show that fungicides do exert a negative effect on bees. Fungicide exposure causes increased virus titres, poor brood rearing and queen emergence, population declines, and higher disease susceptibility^{13,32,33}. Fungicide exposure can also

cause nutritional deficiencies in colonies, resulting in similar symptoms to those of malnutrition even when pollen is available¹³.

Honeybees are eusocial insects living in highly organized societies. As ‘super-organisms’, bee colonies are maintained through specialized tasks performed by individuals of a particular caste³⁴; thus, the entire colony is affected if exposure to toxicity hampers a single task³⁵. One of the worker specializations is the nurse, which is characterized by pheromone-stimulated^{36,37} development of mandibular and hypopharyngeal (or brood-food) glands in the head (at ~6 d old)^{37,38}. Through the secretion of proteinaceous compounds³⁵ and pheromones, such as 10-hydroxy-dec-2-enoic acid^{38,39}, by these glands, nurse bees produce royal jelly after consuming high quantities of pollen^{36,37,40}. As other colony members have limited pollen-digesting capacity, royal jelly is their main source of protein⁴¹ and is used to feed young larvae, adult bees, and the queen^{42,43}. Thus, a hive’s contact with pesticides would primarily occur through nurse bees that consume contaminated pollen, while the nurses themselves may be more susceptible to those pesticides^{44,45}. However, few reports have characterized the impacts of the combination of different classes of pesticides in brood-food glands of honeybees.

Pyraclostrobin is a strobilurin, which is a group of systemic fungicides that inhibit mitochondrial respiration⁴⁶; it is widely detected in the pollen of treated crops and in honeybee colonies^{31,47–49}. Fipronil is a phenylpyrazole, a systemic neurotoxic insecticide that is widely used in agricultural and veterinary applications. Similar to pyraclostrobin, fipronil is detected in crop pollen and honeybee colonies^{11,28,50,51}; it is also highly toxic to the latter²⁰. Based on existing data, we hypothesized that exposure to these two pesticides in nurse honeybees would promote alterations to mandibular and hypopharyngeal glands, possibly through impairing nutrient digestion and absorption.

To investigate this hypothesis, newly emerged bees were chronically exposed to both pyraclostrobin and fipronil and then the condition of their brood-food glands was evaluated. Mandibular glands comprise a reservoir surrounded by secretory cells that form a pseudo-epithelium³⁸, and hypopharyngeal glands are clusters of 8–12 secretory cells connected to the gland’s main channel³⁶. Specifically, we examined secretory-cell height and reservoir volume of the mandibular glands as well as acini size and number in the hypopharyngeal glands. Cell height of the mandibular glands is a main indicator of

development and secretory activity of these glands^{38,52}, whereas acini size in hypopharyngeal glands indicates activity and the amount of royal jelly secreted^{36,38,40,53,54}.

To evaluate the effects of pyraclostrobin and fipronil in doses as close as possible to those to which bees are exposed in the field during pollen collection, we chose a pyraclostrobin dose of 850 ppb, which is between the mean concentrations detected by Pettis et al.³¹ and Yoder et al.⁴⁷ in pollen and beebread. For fipronil, we choose a dose of 2.5 ppb, which is close to the mean dose detected in pollen^{29,50,51}.

Our results will provide insight on how damage to brood-food glands in nurse honeybees impacts colony maintenance. Consequently, this study will contribute to efforts aimed at addressing honeybee population declines through improved management of pesticide application.

Results

Individual and combined effects of pyraclostrobin and fipronil on mandibular glands

In the mandibular glands of pesticide-treated nurses, epithelial secretory cells were significantly decreased in height. Respectively, bees exposed to pyraclostrobin, fipronil, and pyraclostrobin + fipronil saw mean cell-height reduction by 21, 46, and 56%, compared with the control group (Fig. 1). Our results demonstrated that effects of the combination of pesticides on cell height were greater than those produced by exposure to either pesticide alone and indicated an additive effect.

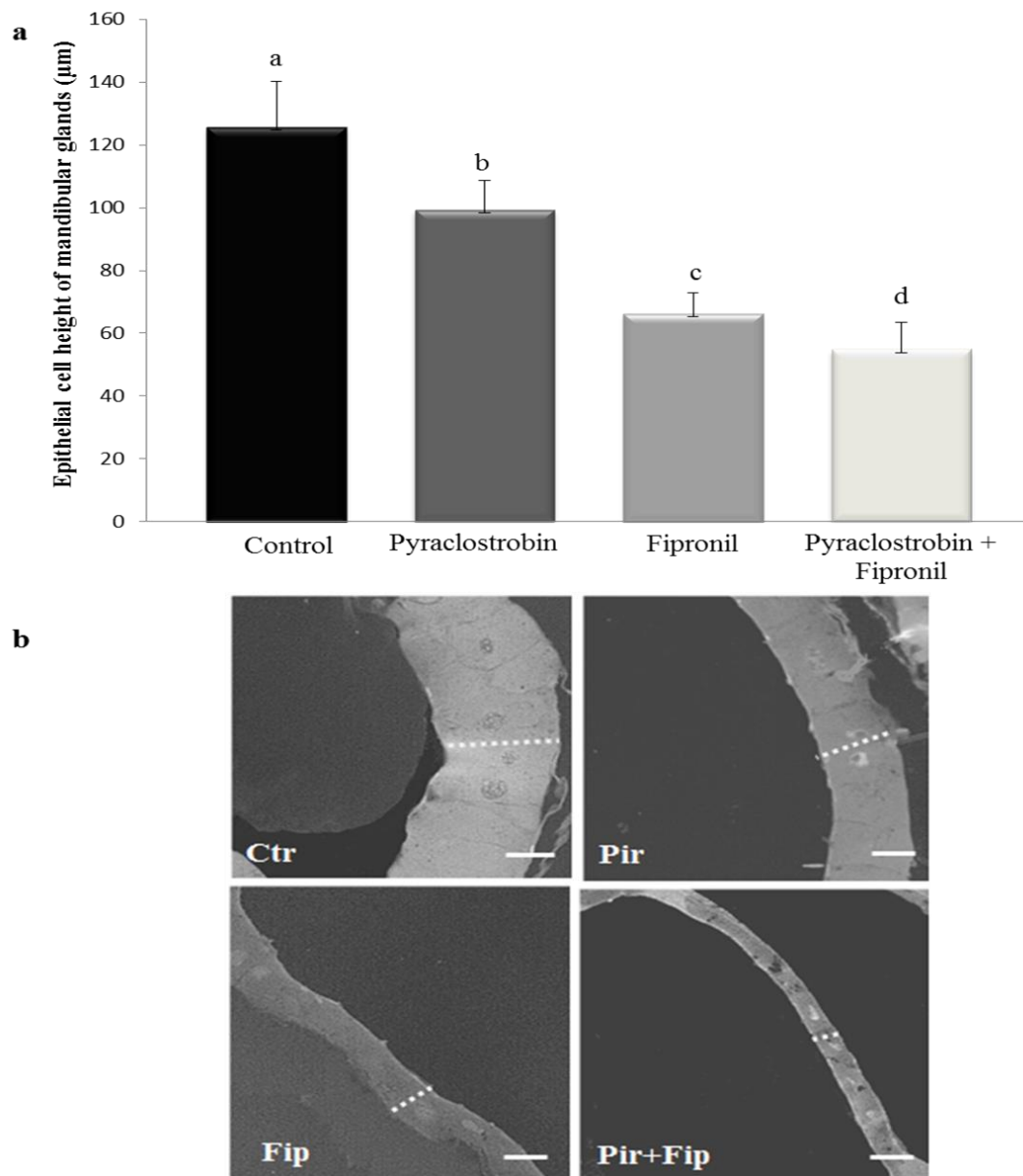


Figure 1. Effects of individual and combined exposure to pyraclostrobin and fipronil on epithelial cell height of mandibular glands in nurse honeybees. (a) Data from 10 histological sections of 10 randomly selected mandibular-gland cells for 10 bees ($n = 1000$ cells). Different letters over the bars represent statistically different groups (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks with Dunn’s post-hoc test for pairwise comparisons, $p < 0.001$). All data are represented as the median with interquartile range. **(b)** Representative histological sections showing mandibular gland epithelial cell height. Ctr: Control; Pir: Pyraclostrobin, Fip: Fipronil; Pir+Fip: Pyraclostrobin + Fipronil. Scale bar: 50 μm

Combined pyraclostrobin + fipronil exposure significantly affected the reservoir area of mandibular glands. Small cross-sectional areas ($<499,000 \mu\text{m}^2$) were more present under combined exposure than in the control, demonstrating an additive effect. Exposure to either pyraclostrobin or fipronil did not result in significantly different reservoir areas from the other two conditions (Fig. 2).

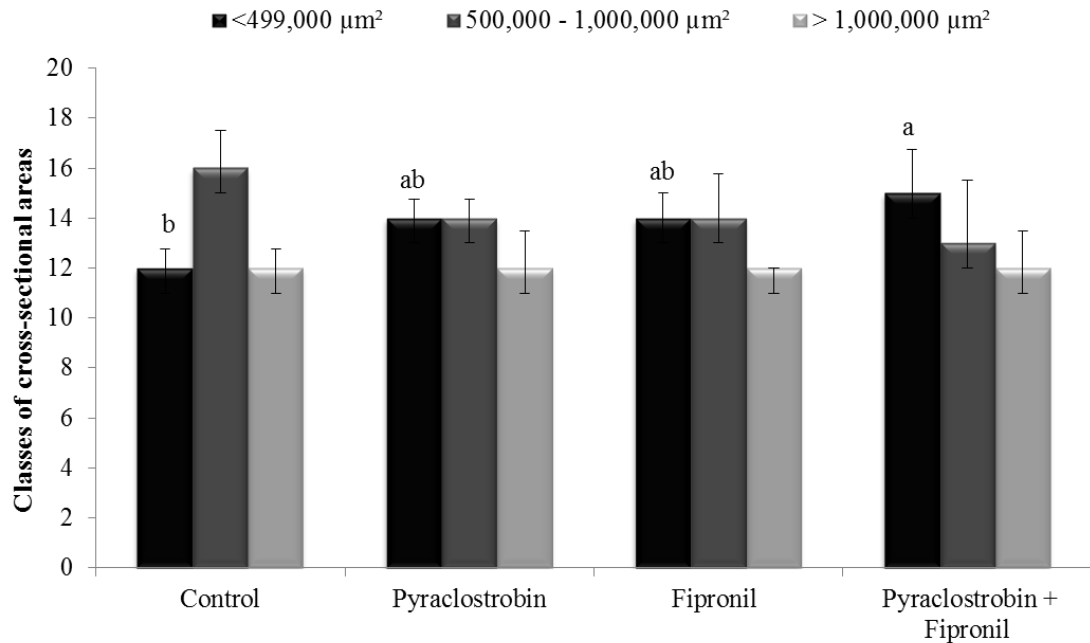


Figure 2. Classes of cross-sectional areas in the mandibular glands of nurse honeybees exposed to treatments of pyraclostrobin and fipronil both individually and combined. The total area (μm^2) of serially collected histological sections (from mandibular gland pairs of 10 honeybees) taken at $30 \mu\text{m}$ intervals (20 sections/bee) were measured and categorized based on their areas 6 d after exposure. Different letters over the bars represent statistically different groups (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks with Dunn’s post-hoc test for pairwise comparisons, $p = 0.003$). All data are represented as the median with interquartile range.

Individual and combined effects of pyraclostrobin and fipronil on hypopharyngeal glands

Pesticide exposure did not significantly alter the total number of acini in the hypopharyngeal glands of nurse honeybees (Table 1).

Treatment	Control	Pyraclostrobin	Fipronil	Pyraclostrobin + Fipronil
Total number of acini	1,230 (1,218–1,340)	1,279 (1,243–1,310)	1,290 (1,267–1,352)	1,290 (1,250–1,319)

Table 1. Total acini count in the hypopharyngeal glands of nurse honeybees. Six days after exposure, total acini were counted in serially collected histological sections taken at 30 μm intervals from each honeybee ($n = 10$). No statistically significant differences were detected (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, $p = 0.418$). Data are presented as medians and interquartile intervals (Q1–Q3).

However, when acini were categorized based on area, a more complete view of the changes that occurred could be characterized demonstrating that pesticide-exposed bees had significantly more acini with reduced areas and significantly fewer with larger areas (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, $p < 0.001$) (Fig. 3, 4). However, the number of acini with reduced areas was not different among pesticide exposure treatments, even when pyraclostrobin and fipronil were combined (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, $p > 0.05$).

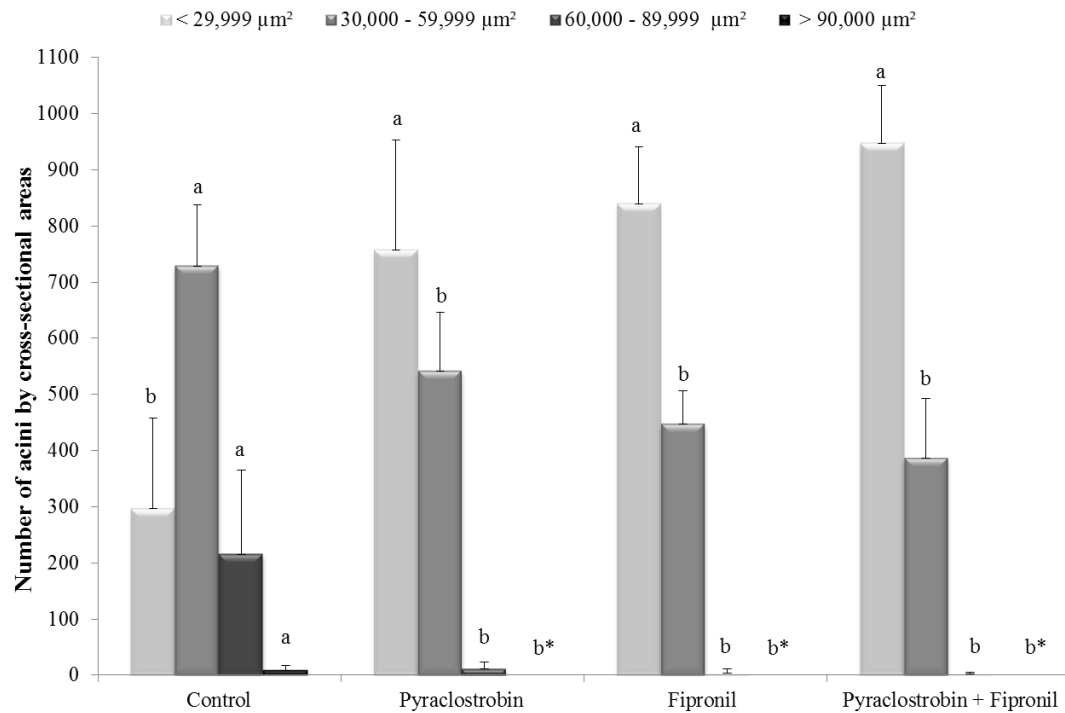


Figure 3. Cross-sectional areas of acini in hypopharyngeal glands measured in nurse honeybees exposed to treatments of pyraclostrobin and fipronil both individually and combined. Acini area was measured in serially collected histological sections taken at 30 μm intervals from each honeybee ($n = 10$) and then categorized by area. Different letters over bar graphs represent statistically different groups (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks with Dunn’s post-hoc test for pairwise comparisons, $p < 0.001$). All data are represented as the median with interquartile range. *Acini with areas $>90,000 \mu\text{m}^2$ were not found.

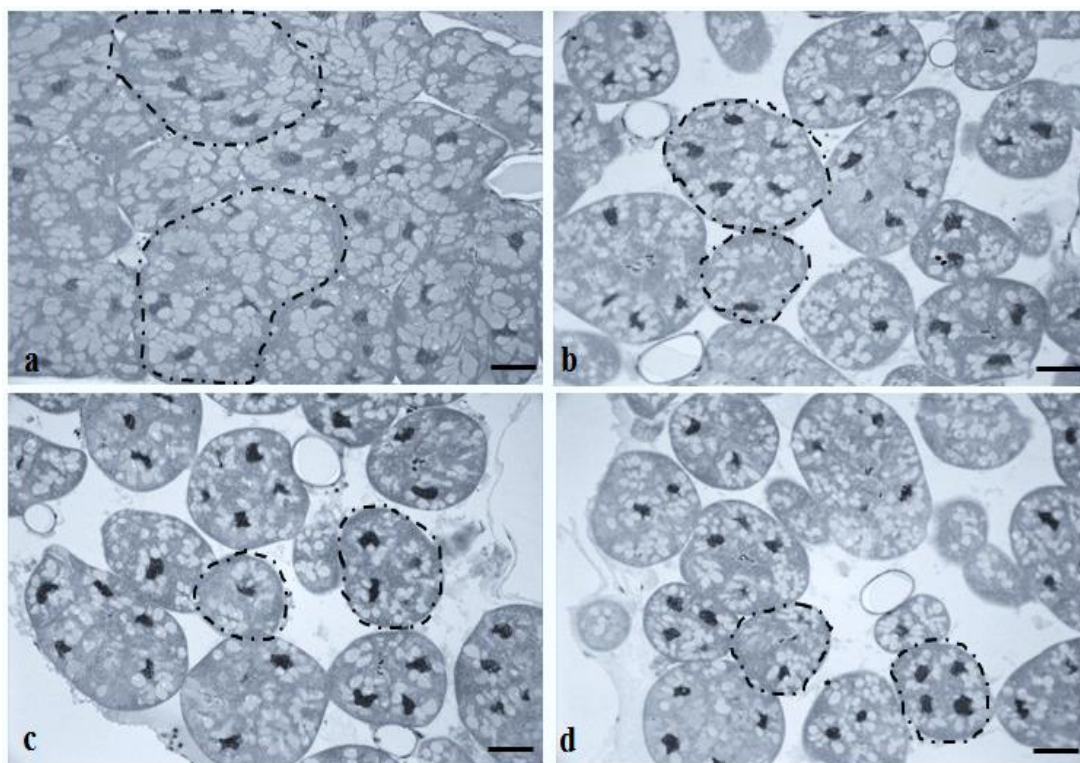


Figure 4. Representative histological sections of hypopharyngeal glands in nurse honeybees. (a) Control and (b) pyraclostrobin, (c) fipronil, and (d) pyraclostrobin + fipronil treatments. Note the greater number of acini (emphasized with dotted lines) with reduced area and fewer protein grains in the acini of honeybees exposed to pesticides. Scale bar: 5 μ m.

Chemical residue analysis and validation

Pollen patties supplied to colonies were tested to confirm pyraclostrobin and fipronil dosages. No pesticide residues were found in control patties. The average residue level in patties containing pyraclostrobin was 870 ± 53 ppb (mean $\pm$ SD). No fipronil residues were detected in our contaminated patties. We also tested for principal fipronil metabolites (fipronil sulfone, fipronil desulfinyl, fipronil sulfide, and fipronil amide), but none were observed within the limits of detection (LOD = 1.5 ppb). However, given the clear biological changes we observed, fipronil was likely present in pollen patties and had an effect even in concentrations below the LOD.

Discussion

Stress-related dysfunction in specialized tasks can affect entire honeybee colonies³⁵. Here, we demonstrated that exposure to field-relevant doses of pyraclostrobin and fipronil caused alterations in the mandibular and hypopharyngeal glands of nurse honeybees. Specifically, we showed that pesticide exposure reduced epithelial-cell height in mandibular glands, and combined pyraclostrobin + fipronil reduced both cell height and reservoir volume, indicating an additive effect of these pesticides. In hypopharyngeal glands, while the total number of acini (approximately 550 acini/gland according to previous reports^{36,38}) was unaffected; more acini had reduced areas in bees exposed to pesticides. However, we observed neither additive nor synergistic effects of pyraclostrobin + fipronil on the development of this gland, likely because of the high reduction of acini area as observed in single-pesticide exposure to fipronil or pyraclostrobin. These data corroborate previous studies showing hypopharyngeal-gland impairment in honeybees exposed to pesticides in the laboratory^{35,55–58} and in bees exposed to pesticides in the field^{58,59}. As far as we are aware, our study is the first to examine both the mandibular and hypopharyngeal glands in honeybees exposed to pesticides. Given the importance of these brood-food glands to colony nutrition^{41–43,53}, our results newly revealed sub-lethal effects that can affect colony maintenance.

The ratio of mandibular to hypopharyngeal gland secretions deposited around each larva reared in the colony varies depending on larval age, sex, and caste^{60,61}. Queen larvae receive only mandibular-gland secretions during the first 3 d, and afterwards receive secretions produced by both the mandibular and hypopharyngeal glands in a 1:1 ratio⁶⁰. Worker larvae are fed secretions from both the mandibular and hypopharyngeal glands in ratios of 1:3 to 1:4⁶², which are mixed with pollen after the third day⁶³. Thus, nurse bees without mandibular glands have difficulty rearing queens⁶⁴. Indeed, our work suggests that pesticide-related impairments to both studied glands in nurses resemble the effects of poor nutrition on the colony and brood-food gland development^{13,65}. Studies have demonstrated that restricting worker access to nutrients during development causes physical and behavioural problems in adult honeybees⁶⁶. Pesticide-linked alterations to brood-food glands can harm brood care through a reduction in royal jelly quantity/quality, which can threaten caste differentiation, bee development, and colony maintenance, all contributors to high colony losses worldwide^{4,67,68}. We highlight that

royal jelly production is related to the development of mandibular and hypopharyngeal glands of nurse honeybees^{36,38,40,52,53,69} and emphasize the importance of direct royal jelly measurement in colonies exposed to pesticides in future studies to evaluate its quantity and quality.

Our study provides additional explanations for why exposure to sub-lethal doses of pesticides can reduce colony growth and queen production¹⁸ while increasing queen supersedure⁷⁰. Queens reared in colonies exposed to pesticides have lower body and ovary weight, if they survive at all⁷¹. Pesticide studies similar to ours have suggested that compromised immunity in developing queens may be the underlying cause of these symptoms³². Here, we hypothesized that nutritional deficits from low-quality/quantity royal jelly produced by nurses with impaired glands would likely contribute to the negative effects of pesticides on queens.

Furthermore, nurse honeybees with hampered hypopharyngeal gland development appear to become foragers more rapidly⁵⁶. Premature foraging activity in honeybees is associated with a reduction in the number of nurses, insufficient brood rearing, and a reduced lifespan, all of which can accelerate colony collapse^{58,72}. If this is the case, then the morphological impairments we observed in both the hypopharyngeal and mandibular glands may cause even faster nurse-to-forager changeover, meaning that the colony is fed low-quality royal jelly over a short period.

All honeybees used in our experiments were from the same colonies, reared under the same conditions, and received the same pollen diet. Through the inclusion of pollen and brood pheromones, this experimental design controlled for potential confounding factors that could hamper the full development of brood-food glands even in the pesticide treatments^{36,40}. Given that the bees were provided with a generally favourable environment with sufficient food resources, we hypothesize that pesticides reduced nutrient digestion and absorption in nurses, contributing to improper glandular development. Indeed, such effects have been reported in insects^{27,28} with studies demonstrating that exposure to pesticides affect the honeybee midgut^{23–25}, including some that demonstrate that fipronil induces death of digestive midgut epithelial cells²⁶. Further studies are necessary to explore the connection between nutrition and pesticides exposure and the glandular development of bees in greater detail. In addition, the effects

of diet quality on bees exposed to pesticides need be considered, because this factor influences hypopharyngeal gland development in nurse bees according to Renzi et al.⁵⁷.

In our study, we focused on two pesticides that can be stored in colonies for long periods and across a range of doses. Our chemical residue analysis of pollen patties confirmed the presence of pyraclostrobin residues within or below the amounts detected in various pollens (mean: $2,787.1 \pm 1,890.1$ ppb³¹; mean: 10,458 and 267 ppb⁴⁹) and in beebread (range: 319 –2,170 ppb⁴⁷). Thus, our dose of pyraclostrobin substantiated a realistic exposure concentration of this fungicide that bees would encounter. Based on studies that have calculated the total amount of pollen consumed by nurse honeybees⁴⁴, if a nurse bee were to feed on the pyraclostrobin-contaminated pollen patties that were detected in our study (mean 870 ppb), it could consume up to a maximum of 10,440 pg of pyraclostrobin within one day of intensive feeding and a mean total amount of 33,930 pg in six days.

We highlight that the fipronil dose that was chosen for bee exposure in this study is within the range of field-relevant doses of this insecticide that have been detected in pollen (mean: 2.3–2.8 ppb^{29,50,51}) and is close to rates broadly authorized for application in fields⁵⁰, which implies that the exposure of bees to this insecticide in the field is similar to the dose used in our study. The dose of fipronil added to pollen patties in our study (2.5 ppb) could result in nurse exposure up to a maximum of 30.0 pg of fipronil within one day of intensive feeding and a total of 97.5 pg in six days, according to one estimate of daily pollen consumption by nurse honeybees⁴⁴. However, observed fipronil residue levels in our patties were lower than we expected. The low field-relevant dose of fipronil that we chose for this study and its probable degradation may have reduced the quantity of fipronil and generated low levels of metabolites that preclude their detection by UHPLC/MS-MS within the LOD in this study. Despite low fipronil concentrations, the contaminated patties caused significant biological alterations in honeybee glands. Thus, residual fipronil and related metabolites were clearly present and had an effect even at doses below the LOD (1.5 ppb) and may be close to the amount of residue detected by Chauzat et al.⁷³ in pollen (fipronil mean content: 1.2 ppb; metabolite mean content: 1.0–1.7 ppb). The effect of fipronil, even at very low concentrations, impaired the brood-food glands of nurse bees, and similar results have been reported for

hypopharyngeal glands by Hatjina et al.⁵⁶ and Heylen et al.³⁵ for bees exposed to the insecticide imidacloprid at sub-lethal doses.

Most studies that found fungicides like pyraclostrobin in pollen and other bee products have not investigated fipronil and their metabolites^{31,49}, but primarily included neonicotinoids, which also have deleterious effects on the hypopharyngeal glands of nurse honeybees^{51,58}. Mullin et al.¹¹ detected pyraclostrobin and fipronil in beehives. The highest concentrations of pyraclostrobin detected in wax, pollen, and bees were 438.0, 265.0, and 9.0 ppb, respectively, while mean detection of fipronil in these samples was 0.2, 0.1, and 21.9 ppb, respectively¹¹. It is important to highlight the persistence of fipronil and pyraclostrobin in the environment owing to their systemic properties^{20,46}. The fact that bees can collect and store contaminated resources in their hives^{10-12,20} and the increase in pesticide detection in migration colonies⁵¹ can increase bee exposure to pesticides such as those used in our study.

In our study, we choose to work with commercial formulations of pyraclostrobin and fipronil as these are more environmentally relevant and represent a better approximation of the occurrence of bee poisoning in the fields. Some inert ingredients (i.e. builder, preservative, filler, adjuvants, or stabilizer components) can also have toxic effects on honeybees and contribute to the declining health of their populations⁷⁴. A study performed by Ciarlo et al.⁷⁵ demonstrated that ingestion of spray adjuvants impairs learning performance of honeybees, and Zhu et al.⁷⁶ confirmed that inert ingredients can be highly toxic to developing honey bees; however, we know of no studies comparing the effects of inert ingredients, active ingredients, and commercial formulations of pesticides on mandibular and hypopharyngeal gland development in honeybees. A full-label disclosure of the composition of pesticides, including inert ingredients, is essential⁷⁶ and can enable a more appropriate risk assessment of these substances to pollinators and non-target species^{20,74}.

Our results provide evidence that pesticide exposure over a short period (six days) results in clear changes to the mandibular and hypopharyngeal glands of nurse honeybees. Because honeybees can access contaminated and non-contaminated pollen in the field, the deleterious effects may not be as obvious as what we observed. However, honeybees can be exposed to multiple pesticides for a far longer period in the field, with

a greater probability of interactions between pesticides. Thus, our results may understate the actual negative impact of pesticide exposure on nurse bees.

Detecting deleterious effects of pesticides in doses that are experienced by pollinators in the field is a critical step toward avoiding the negative impacts that these substances may have on bee maintenance and is crucial in terms of prohibition or re-registration of pesticides. In conclusion, our data highlight the importance of subjecting pesticides to tests that are more rigorous so that sub-lethal effects on important insects like honeybees can be detected. Our results can contribute to the development of policies aimed at promoting more appropriate pesticide risk assessments, mainly at doses close to those that are found in resources collected by bees and to the adoption of management responses aimed at reducing global pesticide application (with emphasis on highly toxic insecticides such as fipronil) to protect pollinators. Because of the negative effects of the fungicide pyraclostrobin on brood food glands, we also highlight the importance of evaluating other molecules of this class that are traditionally considered safe to pollinators and the importance of avoiding spraying blooming crops with them.

Methods

Test subjects were Africanized *Apis mellifera* kept in the apiary of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, under normal living conditions. All colonies were free of diseases and parasites; thus, no treatment against *Varroa destructor* was performed.

Experimental design, diet supply, nurse bee collection, and residue analysis

Experiments were performed during March–May 2016. Two brood combs of emerging bees from five donor colonies were removed, marked, and placed in separate, incubated cages under conditions of 34 °C and 80% relative humidity. The thoraces of newly emerged bees (<10 h) of each donor colony were marked with a specific colour using a non-toxic paint (Posca Paint Pens, Mitsubishi Pencil, Japan) to distinguish colony origin. After marking, we randomly distributed approximately 40 bees of each donor colony to the experimental colonies where they received contaminated food.

Each experimental colony was housed in a nucleus with two sealed brood frames, two open brood frames, one egg-laying frame, and approximately 4,000 bees. The queens in each experimental nucleus were sisters, naturally mated and at four months of age. All frames with pollen/beebread were removed from experimental nuclei 24 h before marked bees were introduced. Pollen traps were installed at the entrances to maximize the amount of contaminated diet consumed. Honey syrup (50% w/v) was supplied *ad libitum* to all colonies.

All pollen and honey used in this study were organic and polyfloral (Breyer & Cia Ltda, União da Vitória, Brazil) to avoid pesticide cross-contamination. Stock pyraclostrobin and fipronil solutions were prepared from formulated products (Comet[®] 250 g a.i. L⁻¹, inert ingredients 802 g L⁻¹, BASF Schwarzheide GmbH, Schwarzheide, Germany; Regent 800WG[®] 800 g a.i. kg⁻¹, inert ingredients 200 g kg⁻¹ BASF Agri-Production SAS, Saint Aubin Les Elbeuf, France). Compositions of inert ingredients were not disclosed on the labels for pesticides used in this study. All commercial pesticides were diluted in distilled water. The final concentration of each treatment dose (pyraclostrobin: 850 ppb; fipronil: 2.5 ppb; pyraclostrobin + fipronil: 850 ppb + 2.5 ppb) was obtained through adding concentrated pyraclostrobin and fipronil solutions to honey syrup (50% w/v). This mixture was added to pollen powder in a 3:1 (pollen to honey syrup) ratio. Pollen patties were homogenized, portioned in cellophane paper (100 g), and stored in a freezer (-20 °C) until use. Control pollen patties without pesticides were prepared following the same procedure.

Residue analysis was performed on two subsamples (50 g) of each pollen patty, based on the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) pesticide extraction method⁷⁷. The QuEChERS citrate-buffering version (European Standard EN 15662)⁷⁸ was modified based on that of a previous study developed for pesticide and antibiotic residue determination in honey samples⁷⁹. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analysis of the residues was performed at the Laboratory of Pesticide Residue Analysis (LARP), Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil. Pesticide standard materials with purity >99% were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Germany). To ensure quality and comparability of results, pesticide residues in pollen patties were validated according to the methods of the Brazilian Health Surveillance Agency

Legislation⁸⁰. Method selectivity was assessed by analysing blank samples and was checked for any interference around the retention time of the target analytes; no interfering compounds were observed by UHPLC-MS/MS. Linearity, calculated based on the spike levels for each analysed compound, resulted in satisfactory calibration curves in the range 0.1–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with determination coefficients (r^2) higher than 0.99 for all compounds and a relative standard deviation below 20%.

Chromatographic separation was performed with an Acquity BEH C18 column (50 × 2.1 mm; 1.7 μm particle size) from Waters (Milford, USA) maintained at 45 °C. Mass spectrometric (MS) analyses were performed using the selected reaction monitoring mode. All MS parameters were optimized under the electrospray ionization (=/-) mode. Because fipronil was not detected initially, its principal metabolites (fipronil sulfone, fipronil desulfinyl, fipronil sulfide, and fipronil amide) were analysed. The LOD was 1.5 ppb for pyraclostrobin, fipronil, and all fipronil metabolites.

Each experimental colony received one contaminated pollen patty daily (for 6 d), placed on the top bars of frames, and the amount acquired by the colony was measured by weighing the food not consumed. This measure ensured that marked honeybees consumed contaminated pollen *ad libitum* from the first day until nursing, when they produce more royal jelly^{36,38,53,54}. The amount of pollen patties acquired daily by the colonies did not differ between the treatment group and the control with an average daily amount consumed of 80 ± 6 g (mean $\pm$ SD) among all colonies (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, $p = 0.328$). Ten marked nurse honeybees (two per donor colony, distinguished according to their colour) were collected in each experimental colony on day 7. Bees were anesthetized in a freezer and then decapitated.

Processing of material for morphological analysis

To increase exoskeleton permeability, entire heads were fixed (4% paraformaldehyde/1× PBS) for 24 h, washed with distilled water, and transferred to a solution containing sodium hypochlorite (5%) and sodium hydroxide (7.5%) for 5 h at room temperature (25 ± 2 °C). Heads were dehydrated using an ascending ethanol series (70, 80, 90, and 95%; 2 h per bath). Subsequently, a cut was made in the anterior and posterior portions of the heads (eliminating about 1 mm of chitin) under a stereomicroscope. The heads were embedded in resin (Leica Historesin Embedding Kit;

Leica, Nussloch, Germany) and sliced with a microtome (Leica RM2155; Germany); frontal cross-sections were 3 μm and separated by 30 μm . Histological sections were made every 30 μm to avoid measuring acini from the same hypopharyngeal gland more than once⁶⁹ and to guarantee evaluation of mandibular glands throughout their extension. Sections were stained with haematoxylin and eosin²⁴. Stained sections were examined under a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica DC300FX camera. Digitized images were analysed morphometrically using the bundled software, Leica Q-win version 3.1 for WindowsTM (Leica, Heidelberg, Germany).

Epithelial cell height in the mandibular glands did not vary much between experimental groups. Thus, the height of 10 cells was measured for each gland section ($n = 10$) per bee ($n = 10$) for a total of 1,000 cell measurements; all glands and cells were randomly selected. Analyses were performed on mean cell height per measured gland. The total area of the mandibular glands (one pair cross-sectioned per animal) was determined from 20 histological sections using 400 measurements in total and then, the glands were classified according their size ($<499,000$; $500,000\text{--}1,000,000$; and $>1,000,000 \mu\text{m}^2$) for statistical analyses to evaluate if a change in the area influenced the reservoir volume of these glands.

For the hypopharyngeal glands, the number and area of acini were measured in all histological sections where they were present. Considering that acini area is the main indicator of hypopharyngeal gland activity and royal jelly secretion^{36,53,54,57,69}, acini area per bee ($n = 10$) was categorized by size ($<29,999$; $30,000\text{--}59,999$; $60,000\text{--}89,999$; and $>90,000 \mu\text{m}^2$) for statistical analyses. This standardized histological method to analyse acini area is less influenced by evaluation bias than is visual assessment of acini size (e.g. choice of acini, ability to extract and measure them) and thus, is more appropriate for measuring acini that display an irregular form⁵⁷.

Statistical analyses

Measurement data were first tested for normality and homogeneity of variance by Kolmogorov–Smirnov and Levene’s test, respectively. Data were compared by Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks and Dunn’s post-hoc tests for pairwise comparisons of all groups using SigmaStat (version 3.5; Systat Software Inc., San Jose, CA). Significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant number: 165696/2014-1).

References

1. Potts, S. G. *et al.* Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* **540**, 220-229 (2016).
2. Klein, A. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **274**, 303-313 (2007).
3. Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A. & Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**, 312-331 (2010).
4. vanEngelsdorp, D. & Meixner, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S80-S95 (2010).
5. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, doi: 10.1126/science.1255957 (2015).
6. Kairo, G. *et al.* Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci Rep.* **6**, 31904; 10.1038/srep31904 (2016).
7. Botías, C. *et al.* Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 12731-12740 (2015).

8. Thompson, H. & Campbell, P. Comment on “Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees”. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 1628-1629 (2016).
9. Botías, C. *et al.* Response to Comment on “Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees”. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 1630-1631 (2016).
10. Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D. Andino, G. & Given, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *Plos One* **7**, e29268 (2012).
11. Mullin, C. A. *et al.* High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implication for honey bee health. *Plos One* **5**, e9754 (2010).
12. Traynor, K.S. *et al.* In-hive pesticide exposome: assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Sci. Rep.* **6**, 33207; doi: 10.1038/srep33207 (2016).
13. DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Dejong, E.W., Chambers, M.L. & Hidalgo, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *J. Econ. Entomol.* **108**, 2518-28 (2015).
14. Decourtye, A. *et al.* Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Con. Tox.* **48**, 242-250 (2005).
15. Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* **491**, 105-108 (2012).
16. Henry, M. *et al.* A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**, 348-350 (2012).

17. Yang, E. C., Chang, H. C., Wu, W. Y. & Chen, Y. W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *Plos One* **7**, e49472 (2012).
18. Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L. & Goulson, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* **336**, 351-352 (2012).
19. Di Prisco, G. *et al.* Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18466-18471 (2013).
20. 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. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 1062-1069 (2015).
21. Wu-Smart, J. & Spivak, M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Sci. Rep.* **6**, 32108; 10.1038/srep32108 (2016).
22. Gregorc, A. & Bowen, I. D. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biol. Internat.* **24**, 319-324 (2000).
23. Forkpah, C., Dixon, L. R., Fahrbach, S.E. & Rueppell, O. Xenobiotic effects on intestinal stem cell proliferation in adult honey bee (*Apis mellifera* L) workers. *Plos One* **9**, e91180 (2014).
24. Oliveira, R. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M. & Malaspina, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* **29**, 1122-1133 (2014).

25. Gregorc, A. & Ellis, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **99**, 200-207 (2011).
26. da Silva Cruz, A., da Silva-Zacarin, E. C., Bueno, O.C. & Malaspina, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biol. Toxicol.* **26**, 165-176 (2010).
27. Dow, J. A. T. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**, 187-328 (1987).
28. Chown, S. & Nicolson, S. W. *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns*. (Oxford University Press, 2004).
29. Stoner K. A. & Eitzer, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *Plos One* **8**, e77550 (2013).
30. Yoshimura, M. A., Luo, Y., Ma, Z. & Michailidies, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodione, and tebuconazole. *Plant Dis.* **88**, 373-378 (2004).
31. Pettis, J. S. *et al.* Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *Plos One* **8**, e70182 (2013).
32. DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y. & Simonds, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* **4**, 71-89 (2013).
33. Simon-Delso, N. *et al.* Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *Plos One* **9**, e103073 (2014).

34. Moritz, R. F. A. & Fuchs, S. Organization of honeybee colonies: characteristics and consequences of a superorganism concept. *Apidologie* **29**, 7-21 (1998).
35. Heylen, H., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R. & Billen, J. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **42**, 103-116 (2011).
36. Deseyn, J. & Billen, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* **36**, 49-57 (2005).
37. Peters, L., Zhu-Salzman, K. & Pankiw, T. Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **56**, 132-137 (2010).
38. Landim, C. C. *Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas*. (Editora UNESP, 2009).
39. Bortolotti, L. & Costa, C. Chemical communication in the honey bee society in *Neurobiology of Chemical Communication* (ed. Mucignat-Caretta, C.) 147-210 (CRC Press/Taylor & Francis, 2014).
40. Hrassnigg, N. & Crailsheim, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.* **44**, 929-939 (1998).
41. Crailsheim, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **29**, 97-112 (1998).
42. Michener C. D. *The Social Behavior of the Bees*. (Harvard University Press, 1974).
43. Crailsheim, K. The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B* **162**, 681-689 (1992).

44. Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P. & Touffet-Briens, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**, 71-83 (2005).
45. Halm, M. P., Rortais, A., Arnold, G., Taséi, J. N. & Rault, S. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2448-2454 (2006).
46. Ivic, D. Curative and eradivative effects of fungicides in *Fungicides* (ed. Carisse, O.) 1-22 (InTech, 2010).
47. Yoder, J. A. *et al.* Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **76**, 587-600 (2013).
48. David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Goulson, D. & Hill, E. M. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8151-8162 (2015).
49. Frazier, M.T. *et al.* Assessing honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging populations and the potential impact of pesticides on eight U.S. crops. *J. Econ. Entomol.* **108**, 2141-2152 (2015).
50. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA J.* **3158**, 1-51 (2013).
51. Bernal, J. *et al.* Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J. Econ. Entomol.* **103**, 1964-1971 (2010).

52. Santos, D. S., Souza, E. A., Vieira, C. U., Zanuncio, J. C. & Serrão, J. E. Morphology of mandibular and intramandibular glands in workers and virgin queens of *Melipona scutellaris*. *Apidologie* **46**, 23-34 (2015).
53. Knecht, D. & Kaatz, H. H. Patterns of larval food-production by hypopharyngeal glands in adult worker honey-bees. *Apidologie* **21**, 457-468 (1990).
54. Rahman, S., Thangkhiew, I. & Hajong, S. R. Hypopharyngeal gland activity in task-specific workers under brood and broodless conditions in *Apis cerana indica* (Fab.). *J. Apic. Sci.* **58**, 61-70 (2014).
55. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42. (2003).
56. Smodiš Šker, M. I. & Gregorc, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* **41**, 73-86 (2010).
57. Hatjina, F. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* **44**, 467-480 (2013).
58. Renzi, M. T. *et al.* Combined effect of pollen quality and thiamethoxam on hypopharyngeal gland development and protein content in *Apis mellifera*. *Apidologie* **47**, 779-788 (2016).
59. De Smet, L. *et al.* Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *Plos One* **12**, e0171529 (2017).

60. Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C. P. W., Rosenkranz, P. & Wallner, K. Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. *Apidologie* **48**, 353-363 (2017).
61. Beetsma, J. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World* **60**, 24-39 (1979).
62. Brouwers, E. V. M., Ebert, R. & Beetsma, J. Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apic. Res.* **26**, 11-23 (1987).
63. Jung-Hoffmann, I. Die determination von königin und arbeiterin der honigbiene. *Z. Bienenforsch.* **8**, 296-322 (1966).
64. Haydak, M. H. Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 143-156 (1970).
65. Peng, Y. S. & Jay, S. C. Larval rearing by worker honey bees lacking their mandibular glands II: rearing by larger numbers of worker bees. *Can. Ent.* **111**, 101-104 (1979).
66. Degrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E. & Huang, M. H. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **56**, 1184-1191 (2010).
67. Scofield, H. N. & Mattila, H. R. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *Plos One* **10**, e0121731 (2015).
68. Lee, K. V. *et al.* A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie* **46**, 292-305 (2015).
69. Seitz, N. *et al.* A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *J. Apic. Res.* **54**, 292-304 (2016).

70. Bovi, T. S., Onari, P., Santos, S. A. A., Justulin, L. A. & Orsi, R. O. Apitoxin harvest impairs hypopharyngeal gland structure in *Apis mellifera* honey bees. *Apidologie* doi: 10.1007/s13592-017-0520-8 (2017).
71. Sandrock, C. *et al.* Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *Plos One* **9**, e103592 (2014).
72. Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B. & Glenn, T. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.* **95**, 28-35 (2002).
73. Khoury, D. S., Myerscough, M. R. & Barron, A. B. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *Plos One* **6**, e18491 (2011).
74. Chauzat, M-P. *et al.* An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* **30**, 103-111 (2011).
75. Mullin, C. A., Fine, J. D., Reynolds, R. D. & Frazier, M. T. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. *Front. Public Health.* **4**, 92 (2016).
76. Ciarlo, T. J., Mullin, C. A., Frazier, J. L. & Schmehl, D.R. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *Plos One* **7**, e40848 (2012).
77. Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A. & Frazier, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *Plos One* **9**, e77547 (2014).
78. Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. & Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-

phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **83**, 412 (2003).

79. European Standard Method EN 15662. Foods of plant origin – determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE (QuEChERS method). <http://www.cen.eu> (2008).

80. Orso, D. *et al.* Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Method* **9**, 1638-1653 (2016).

CAPÍTULO III

Alterações no proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* nutrízes expostas a doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina e inseticida fipronil

Resumo

O declínio mundial da população de abelhas tem gerado preocupações devido à importância desses insetos na polinização e produção apícola. No presente estudo foram avaliadas alterações no proteoma da cabeça de abelhas *Apis mellifera* nutrízes expostas a dietas contaminadas com o fungicida piraclostrobina (850 ppb), inseticida fipronil (2,5 ppb) de forma isolada e em associação, utilizando a técnica 2D-PAGE com identificação das proteínas por ESI-MS/MS. A exposição de abelhas nutrízes aos agrotóxicos reduziu a expressão de quatro proteínas pertencentes à família da geleia real (Mrjp1, Mrjp2, Mrjp4, Mrjp5), bem como de proteínas envolvidas em diferentes vias celulares, incluindo: metabolismo de carboidratos (3); síntese de energia (8); sistema antioxidante (18); processos de biossíntese (7); metabolismo de aminoácidos (5); transcrição e tradução (6); enovelamento e ligação a proteínas (7); sistema olfatório (1); aprendizagem e memória (2). A exposição de abelhas nutrízes a doses ambientalmente relevantes dos agrotóxicos afetou importantes processos e vias metabólicas que podem prejudicar a nutrição, sanidade e manutenção das colônias. Destaca-se a importância de realizar estudos detalhados sobre os impactos da exposição de polinizadores a agrotóxicos e de reduzir sua exposição e essas moléculas que podem agir como catalizadores para redução da biodiversidade e extinção de espécies.

Introdução

A redução de colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) manejadas e da abundância de espécies de polinizadores nativos, bem como dos fatores associados a esse fenômeno são motivos de preocupação global (Johnson et al., 2010; Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; Potts et al., 2016), principalmente devido ao comprometimento da produção de alimentos, manutenção dos ecossistemas e prejuízos à produção apícola associados à redução de polinizadores (Kevan & Phillips, 2001; Potts et al., 2010; Potts et al., 2016).

A exposição crônica das abelhas a agrotóxicos, e a interação dessas moléculas com outros estressores, que incluem a perda de habitats, redução de recursos florais, aumento da incidência e da dispersão de doenças e parasitas representam as principais ameaças à manutenção dos polinizadores (Goulson et al., 2015; Kairo et al., 2016). Estudos demonstram que os recursos coletados pelas abelhas (néctar, pólen e água) podem ser contaminados por doses subletais de diversos agrotóxicos (Johnson et al., 2010; Mullin et al., 2010; Traynor et al., 2016; Colwell et al., 2017) que quando levados a colônia podem prejudicar todas as castas, incluindo os indivíduos em desenvolvimento e as abelhas adultas de diferentes idades (Roat et al., 2014; Zaluski et al., 2015; Kairo et al., 2016; Traynor et al., 2016).

As abelhas melíferas vivem em sociedades altamente organizadas, caracterizadas pela presença de castas (rainhas, zangões e operárias) que apresentam funções específicas; as funções das operárias podem mudar em função da idade (polietismo etário) e da necessidade da colônia (Van Veen, 2014). Em abelhas operárias com idade entre 06 e 12 dias, denominadas nutrízes, destaca-se a produção de geleia real que é necessária à criação das larvas, alimentação de abelhas adultas e da rainha (Crailsheim, 1998). A secreção da geleia real ocorre em glândulas especializadas localizadas na cabeça das abelhas, denominadas mandibulares e hipofaringeanas, sendo a ingestão de pólen fator fundamental para o desenvolvimento e capacidade de síntese de proteínas nessas glândulas (Deseyn & Billen, 2005; Peters et al., 2010). Nesse cenário é importante considerar a presença de resíduos de agrotóxicos, incluindo inseticidas e fungicidas sistêmicos no pólen (Chauzat et al., 2006; Chauzat et al., 2011; David et al., 2015; Colwell et al., 2017) que podem prejudicar o desenvolvimento de glândulas associadas a síntese de geleia real (Heylen et al., 2011; Smodiš Šker & Gregorc, 2010; Hatjina et al.,

2013; Zaluski et al., dados não publicados) e potencialmente afetar a quantidade e qualidade da secreção produzida por essas estruturas. Além disso, a exposição de abelhas a agrotóxicos pode ocasionar distúrbios que afetam a longevidade, comportamento, aprendizagem, memória, forrageamento e coordenação motora desses insetos (Roat et al., 2014; Frazier et al., 2015; Zaluski et al., 2015). Muitas dessas alterações se devem a ação neurotóxica de alguns agrotóxicos (Roat et al., 2014; Zaluski et al., 2015) ou ao desequilíbrio de funções fisiológicas e/ou bioquímicas provocadas por essas moléculas (Derecka et al., 2013; Nicodemo et al., 2014; Roat et al., 2014; Słowińska et al., 2016; Kairo et al., 2016; Mao et al., 2017).

O sequenciamento e anotação do genoma das abelhas melíferas (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) tem contribuído para o desenvolvimento de estudos genômicos e proteômicos que permitem melhor compreensão das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento das abelhas (Feng et al., 2009; Wolter et al. 2013), exposição a patógenos (Han et al., 2013; Zhang et al., 2014), exposição a agrotóxicos (Derecka et al., 2013; Roat et al., 2014; Mao et al., 2017) ou a moléculas naturalmente presentes no pólen e néctar de algumas plantas, como a nicotina (Du Rand et al., 2015; Du Rand et al., 2017). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para avaliar alterações no proteoma de abelhas expostas a agrotóxicos. Em estudo proteômico realizado no cérebro de abelhas expostas ao inseticida fipronil foram identificadas alterações na expressão de proteínas relacionadas à síntese de energia, imunidade, apoptose, visão, formação de sinapses, memória e aprendizagem (Roat et al., 2014), sendo fundamental a realização de estudos adicionais nessa área visando melhor entendimento dos impactos da exposição das abelhas aos agrotóxicos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações no proteoma da cabeça de abelhas nutrízes expostas a doses ambientalmente relevantes do inseticida fipronil, fungicida piraclostrobina e suas associações. A cabeça das abelhas foi selecionada por apresentar importantes órgãos relacionados à síntese de geleia real (glândulas mandibulares e hipofaríngeas), estruturas sensoriais (antenas), acuidade visual (olhos compostos, ocelos) e o cérebro, responsável pela coordenação e resposta a estímulos. Dessa forma, foi possível avaliar simultaneamente a ocorrência de alterações em proteínas que podem comprometer a adequada resposta das abelhas nutrízes a estímulos e a execução das suas funções, e consequentemente afetar a manutenção das colônias. A

exposição das abelhas nutrízes foi realizada mediante fornecimento de pólen contaminado com o inseticida sistêmico fipronil e fungicida piraclostrobina, em doses próximas a já detectadas no pólen de diferentes cultivos agrícolas e em colônias (Bernal et al., 2010; European Food Safety Authority, 2013; Pettis et al., 2013; Stoner & Eitzer, 2013; Yoder et al., 2013; Frazier et al., 2015).

Os resultados do presente estudo demonstram que importantes processos metabólicos são alterados em abelhas nutrízes expostas a agrotóxicos, com destaque para redução da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e síntese de energia, sistema antioxidante e em proteínas que compõe a geleia real. Esse estudo pode contribuir para maior entendimento dos impactos da exposição de abelhas a agrotóxicos, demonstrando que algumas alterações metabólicas podem afetar diretamente a nutrição, sanidade e manutenção desses polinizadores, contribuindo para redução de suas populações.

Resultados e discussão

Análise de diferença de expressão de *spots* proteicos utilizando a técnica 2D-PAGE

As alterações no proteoma da cabeça de abelhas melíferas nutrízes expostas a doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações (piraclostrobina + fipronil) foram examinadas utilizando a técnica 2D PAGE, tendo como referência o proteoma de abelhas não expostas a esses estressores (controle). Foram obtidos 227, 215, 221 e 211 *spots* proteicos nos géis do grupo controle, piraclostrobina, fipronil e piraclostrobina + fipronil, respectivamente, em uma variação de Mm 9,66 – 136.100 kDa e variação de pI de 4,07 – 9,93. A correlação média (*match*) entre os quatro géis obtidos para cada tratamento foi de 98%, o que confirma a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados.

A análise das imagens dos géis de cada tratamento permitiu determinar a potencial alteração na expressão das proteínas utilizando o volume normalizado (%V) dos *spots* (Feng et al., 2009; Mehaffy et al., 2010; Roat et al., 2014; Braga et al., 2017). A análise de expressão dos *spots* proteicos entre o grupo controle × exposto a piraclostrobina demonstrou 215 *spots* coincidentes e 55 *spots* com diferença de expressão (10 apresentaram aumento de expressão, 33 redução de expressão e 12 estavam ausentes

na exposição). Para o grupo controle × fipronil houve 221 *spots* coincidentes e 56 *spots* com diferença de expressão (06 apresentaram aumento de expressão, 44 redução de expressão e 06 estavam ausentes na exposição). Para o grupo controle × piraclostrobina + fipronil houve 211 *spots* coincidentes e 74 *spots* com diferença de expressão (15 apresentaram aumento de expressão, 43 apresentaram redução de expressão e 16 estavam ausentes na exposição aos agrotóxicos). Os géis representativos de cada tratamento são apresentados na Figura 1.

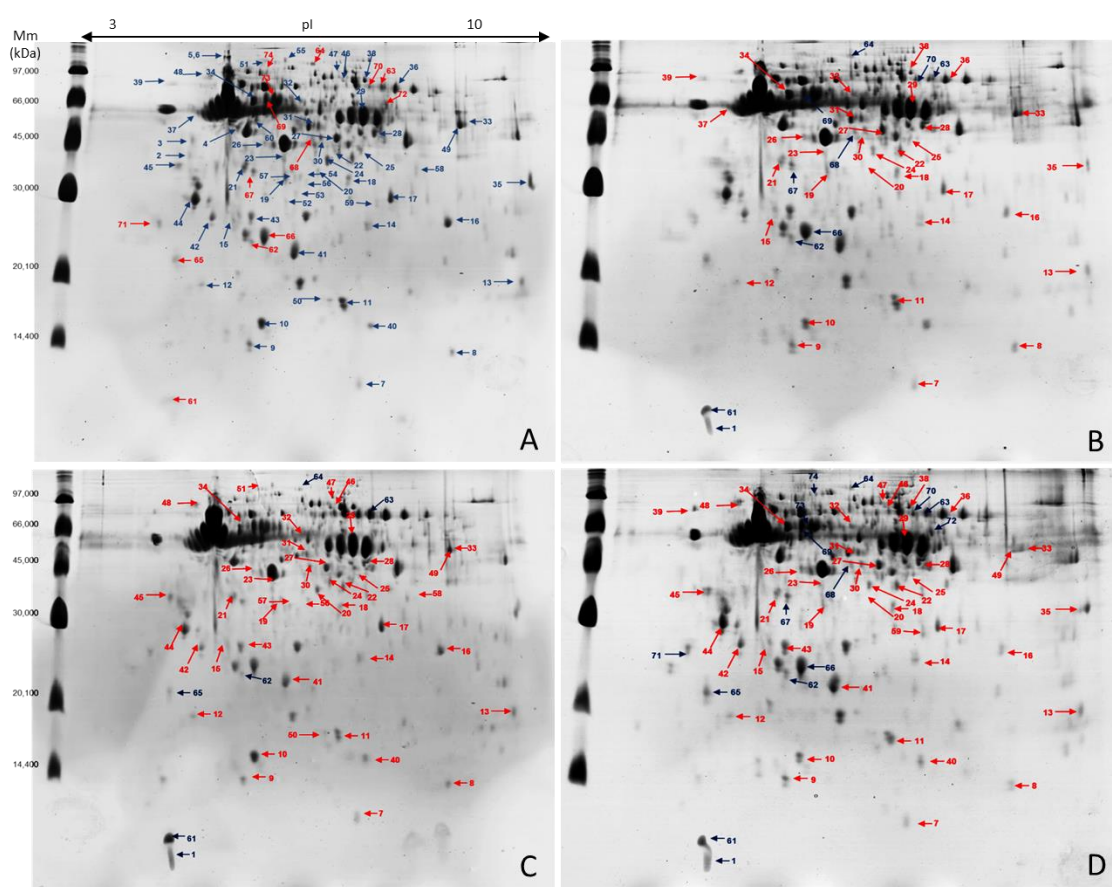


Figura 1. Géis 2D PAGE representativos de cabeças de abelhas (*Apis mellifera*) nutrízes expostas a doses ambientalmente relevantes do fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações. Os números indicam os *spots* diferentemente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) considerando a %V dos *spots*. As comparações foram realizadas entre o grupo controle e os grupos expostos aos agrotóxicos. A) controle; B) piraclostrobina; C) fipronil; D) piraclostrobina + fipronil. *Spots* indicados em vermelho representam redução na expressão e *spots* indicados em azul representam aumento de expressão comparando grupos expostos aos agrotóxicos em relação ao controle.

Os *spots* que apresentaram diferença de expressão foram analisados por ESI-MS/MS, sendo identificadas 93 proteínas nos *spots* que apresentaram redução de expressão nos grupos expostos aos agrotóxicos e 19 proteínas em *spots* que apresentaram aumento de expressão nesses grupos. Dentre as 21 proteínas identificadas em *spots* que apareceram exclusivamente no grupo controle, 15 dessas também foram identificadas em *spots* que apresentaram redução de expressão nos grupos expostos aos agrotóxicos. Em quatro *spots* analisados não foi possível identificar as proteínas devido aos baixos valores dos *scores* observados durante as pesquisas realizadas no banco de dados. O *score* das proteínas identificadas variou de 70,58 a 47.226,49 e a porcentagem de cobertura das sequências variou de 5,24 a 92,76%. Algumas proteínas apareceram em diferentes *spots* proteicos possivelmente devido a modificações pós traducionais (PTMs) que alteram a massa molecular e pI das proteínas (Graves & Haystead, 2002; Feng et al., 2009), bem como mais de uma proteína foi identificada em um único *spot*, como observado por outros estudos (Mehaffy et al., 2010; Sizova, 2011, Braga et al., 2017). A identificação de mais de uma proteína em único *spot* pode ocorrer devido a PTMs (Krishna & Wold, 1997; Parker et al., 2010) ou em proteínas pertencentes a famílias multigênicas ou isoformas, que geralmente apresentam massa molecular e ponto isoelétrico semelhantes (Chan & Schwartz, 2002).

As sequências das proteínas foram analisadas utilizando a ferramenta *Blast2GO* para acesso aos termos do *Gene Ontology* (GO) e posterior identificação das vias metabólicas realizada no banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), o que permitiu sua separação em grupos funcionais. A lista completa das proteínas identificadas, incluindo a potencial alteração da expressão para cada tratamento, o número de acesso, *score*, pI e MM experimental, pI e MM teórica, porcentagem de cobertura e função molecular são apresentados na Tabela Suplementar 1 e 2.

A exposição das abelhas nutrizas a agrotóxicos reduz a expressão de proteínas da família das principais proteínas da geleia real (MRJPs)

Dentre as proteínas que apresentaram redução de expressão em abelhas nutrizas expostas ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações, ou que foram identificadas apenas em *spots* presentes no grupo controle destacam-se quatro das

principais proteínas da geleia real, denominadas *Major Royal Jelly Proteins* (MRJPs): MRJP1, MRJP2, MRJP4, MRJP5. Em geral, houve menor expressão dessas proteínas em abelhas expostas à associação dos agrotóxicos (Tabela Suplementar 1). Estudos prévios demonstraram que a exposição de abelhas nutrízes a dietas contaminadas com agrotóxicos ocasiona alterações morfológicas em glândulas hipofaríngeas (Heylen et al., 2011; Smodiš Šker & Gregorc, 2010; Hatjina et al., 2013) e em glândulas hipofaríngeas e mandibulares (Zaluski et al., dados não publicados) que são responsáveis pela síntese de geleia real, sugerindo que essas alterações comprometem de forma quantitativa e qualitativa a secreção dessas proteínas. As análises proteômicas realizadas no presente estudo demonstram pela primeira vez que a exposição das abelhas nutrízes ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e as suas associações pode levar a alterações qualitativas em algumas das principais proteínas da geleia real. Essas alterações podem comprometer a nutrição das larvas, abelhas adultas e da rainha, afetando o desenvolvimento e a manutenção das colônias.

As proteínas da geleia real possuem importante função na nutrição da colônia e podem influenciar a diferenciação de castas e a sanidade das abelhas (Buttstedt et al., 2013; Buttstedt et al., 2014; Vezeteu et al., 2017). Algumas proteínas da geleia real, especialmente a Mrjp1, apresentam atividade antimicrobiana (Vezeteu et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017), portanto, a redução da expressão dessa proteína em colônias expostas a agrotóxicos pode aumentar sua susceptibilidade a patógenos, prejudicando a criação de larvas. Estudos prévios relataram comprometimento do crescimento de colônias e da produção de rainhas (Whitehorn et al., 2012), maiores taxas de substituição de rainhas (Sandrock et al., 2014), comprometimento da imunidade (DeGrandi-Hoffman et al., 2013) e do desenvolvimento fisiológico de rainhas (Haarmann et al., 2002) criadas em colônias expostas a agrotóxicos. Os resultados do presente estudo reforçam que esses fatores podem estar associados a alterações na qualidade da geleia real produzida por abelhas nutrízes que consomem dietas contaminadas. Futuros estudos para avaliar a qualidade e quantidade de geleia real produzida em colônias expostas a agrotóxicos são importantes para confirmar os efeitos observados no presente estudo e para aumentar a compreensão dos impactos da exposição das abelhas a agrotóxicos.

Alterações no metabolismo de abelhas nutrizas expostas a agrotóxicos

As alterações na expressão de proteínas envolvidas em diferentes processos metabólicos em abelhas expostas individualmente ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e as suas associações são sumarizadas no Quadro 1. A exposição das abelhas a associação de piraclostrobina e fipronil alterou a expressão de maior número de proteínas, bem como, ocasionou maior alteração na sua expressão, caracterizando um efeito aditivo para algumas proteínas (Tabela Suplementar 1 e 2).

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.

Processo Biológico/ Função	Piraclostrobina		Fipronil		Piraclostrobina + Fipronil	
	Super- expressão	Sub- regulação	Super- expressão	Sub- regulação	Super- expressão	Sub- regulação
Proteínas da Geleia Real (Mrjps)	—	4	—	4	—	4
Metabolismo de carboidratos e síntese de energia	2	11	1	11	3	11
Sistema antioxidante	—	13	—	17	—	19
Processos de biossíntese	—	5	—	7	—	7
Metabolismo de aminoácidos	—	4	—	5	—	5
Transcrição/tradução	1	4	—	5	1	6
Ligação/enovelamento de proteínas	5	7	3	7	5	7
Sistema olfativo	—	1	—	1	—	1
Aprendizagem e memória	—	1	—	2	—	2
Resposta ao estresse	3	—	3	—	3	—
Outras/desconhecidas funções	5	24	2	23	9	30
Total	16	73	9	82	21	92

Nas abelhas expostas aos agrotóxicos destaca-se a redução da expressão de quatro grupos principais de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos/síntese de energia, sistema antioxidante e em processos de biossíntese. As demais proteínas que apresentaram redução de expressão apresentam funções relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, transcrição e tradução, enovelamento de proteínas e ligação, sistema olfatório, aprendizagem e memória. Também foram identificadas proteínas com funções diversas e/ou desconhecidas (Quadro 1; Tabela Suplementar 1). A análise das sequências dessas proteínas realizada no programa *Blast2GO* demonstrou que seus *scores* (Conesa & Gotz, 2008) estão associados principalmente à região extracelular, citoplasma e complexos de proteínas; as funções moleculares de ligação a proteínas, atividade de transferase, ligação a íons metálicos e a ATP; e aos processos biológicos de óxido redução, transporte, processo metabólico de proteínas celulares e processo glicolítico (Figura 2).

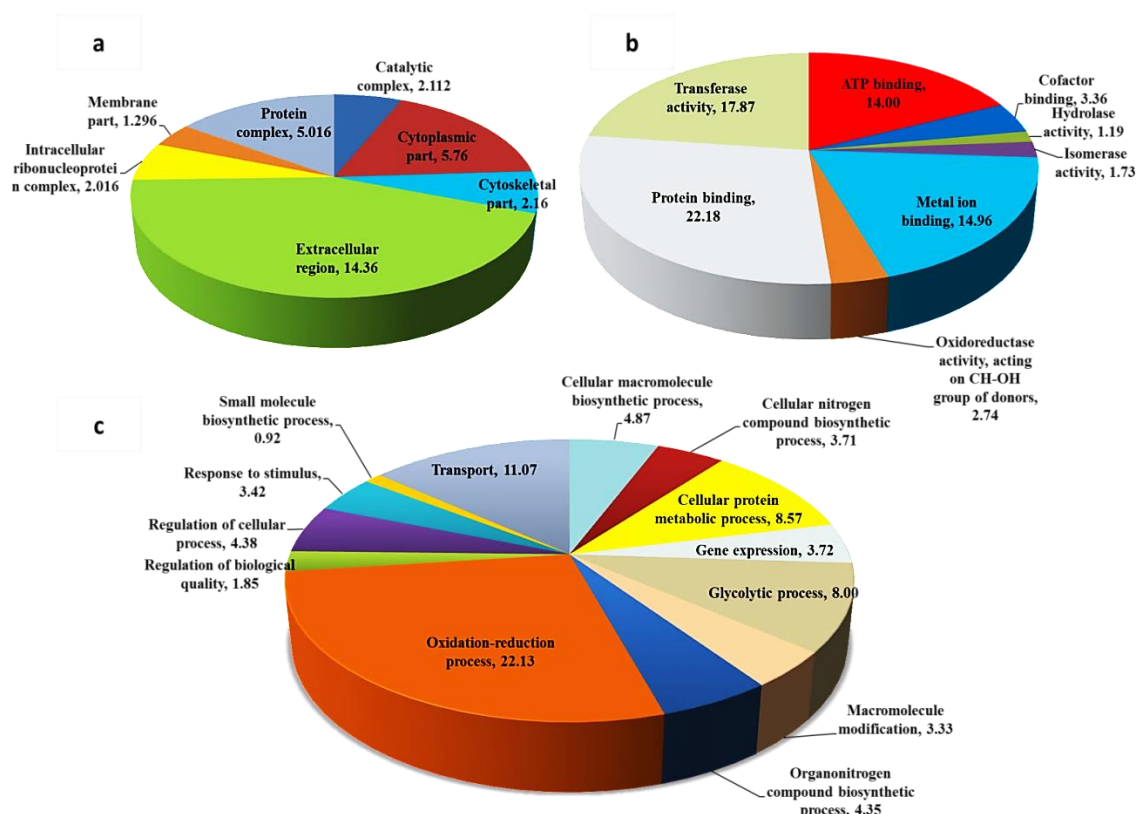


Figura 2. Classificação das sequências das proteínas que apresentaram redução de expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrízes expostas ao fungicida piraclostrobina e ao inseticida fipronil. a: Componente celular. b: Função molecular. c: Função biológica.

A produção de geleia real é uma das principais funções das abelhas nutrizas; e a síntese dessa secreção ocorre em glândulas especializadas, denominadas mandibulares e hipofaríngeas, que possuem elevada atividade durante a fase de nutriz (Deseyn & Billen, 2005; Landim, 2009; Feng et al., 2009; Peters et al., 2010). A manutenção dos processos de síntese proteica em organismos eucariontes envolve alto consumo de ATP (Lane & Martin, 2010; Pontes et al., 2015) que por sua vez aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Corona & Robinson, 2006; Murphy, 2009; Feng et al., 2009). A geração de ROS estimula a expressão de enzimas antioxidantes que são fundamentais para a manutenção da homeostase dos organismos (Du Rand et al., 2015; Du Rand et al., 2017). O padrão de expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, síntese de ATP, processos de biossíntese e de enzimas antioxidantes em abelhas nutrizas do grupo controle demonstra que essas abelhas apresentam elevada atividade metabólica necessária para execução de sua função na colônia. Esses resultados corroboram com estudos realizados previamente, que caracterizaram mudanças no proteoma de glândulas hipofaríngeas em abelhas com diferentes idades e verificaram aumento de expressão de proteínas associadas a esses processos em abelhas nutrizas (Feng et al., 2009).

Em oposição, a redução e/ou a ausência da expressão das enzimas *fructose-bisphosphate aldolase* (EC 4.1.2.13), *triosephosphate isomerase* (EC 5.3.1.1), *phosphoglycerate mutase* (EC 5.4.2.12), *malate dehydrogenase* (EC 1.1.1.37), *aldose 1-epimerase* (EC 5.1.3.3), *glucose-6-phosphate isomerase* (EC 5.3.1.9), *phosphomannomutase* (EC 5.4.2.8) que participam dos processos de glicólise e gliconeogênese; bem como das enzimas *inorganic pyrophosphatase* (EC 3.6.1.1), *arginine kinase* (EC 2.7.3.3), *transaldolase* (EC 2.2.1.2) e *phosphoglycolate phosphatase-like* (EC 3.1.3.18) que atuam no metabolismo de carboidratos e alimentam a via glicolítica, caracterizam importantes alterações em abelhas expostas aos agrotóxicos piraclostrobina e fipronil de forma isolada e em associação. A redução da expressão dessas enzimas pode reduzir a síntese de ATP e levar a depleção de energia necessária para manutenção dos processos de biossíntese de proteínas (podendo comprometer a síntese da geleia real em abelhas nutrizas) e dos processos de detoxicação que envolvem elevado gasto energético nos insetos (Guedes et al., 2006; Kliot & Ghanim, 2012; Du Rand et al., 2015). Destaca-se também a redução da expressão da proteína *arginine*

kinase que é responsável pelo transporte de ATP requerido para processos bioquímicos do sistema visual, como a regeneração de pigmentos na retina (Roat et al., 2014). De acordo com Roat et al. (2014), que também observaram redução da expressão dessa enzima em abelhas expostas ao fipronil, a alteração na expressão dessa enzima pode prejudicar a visão das abelhas.

Os resultados do presente trabalho corroboram com estudos prévios que demonstraram comprometimento do metabolismo energético em abelhas expostas a agrotóxicos (Derecka et al., 2013; Mao et al., 2017). A supressão da produção de ATP pela piraclostrobina pode ocorrer devido a sua ligação ao sítio Qo do complexo enzimático do citocromo bc1 (complexo III) que bloqueia a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c1 e interrompe a produção de ATP (Anke 1995). Além disso, Mao et al. (2017) verificaram que abelhas expostas a fungicidas podem não metabolizar alguns fitoquímicos naturalmente presentes no pólen, e essas moléculas podem comprometer a síntese de ATP. Já o fipronil pode reduzir a síntese de ATP em abelhas devido à inibição da cadeia transportadora de elétrons (Nicodemo et al., 2014). A expressão de enzimas que atuam nos processos de glicólise e gliconeogênese é regulada em função da sua atividade, visando atender a necessidade metabólica dos organismos (Berg et al., 2002), portanto, a ação inibitória do fipronil e da piraclostrobina sobre a cadeia transportadora de elétrons e a possível influência de fitoquímicos presentes no pólen podem ter contribuído para redução da expressão dessas enzimas que atuam na síntese de ATP. A maior redução da expressão de algumas enzimas que atuam na síntese de energia caracteriza um efeito aditivo, que pode ser derivado da interação entre o fipronil, piraclostrobina e de fitoquímicos presentes no pólen.

Além da redução da expressão de proteínas associadas ao metabolismo energético, as abelhas nutrízes expostas aos agrotóxicos piraclostrobina e fipronil apresentaram sub-regulação de enzimas do sistema antioxidante. Destaca-se a redução de expressão das enzimas *superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *peroxiredoxin 1*, *pyridoxine pyridoxamine 5 -phosphate oxidase*, *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like*, *lambda-crystallin homolog*, *trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase-like*, *glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]*, *malate dehydrogenase*, *aldose reductase-like*, *glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]*, *probable medium-chain specific acyl- mitochondrial* em abelhas expostas isoladamente e a associação dos

agrotóxicos. As enzimas *glutathione S-transferase S1* e *3-hydroxyacyl- dehydrogenase type-2* apresentaram redução de expressão apenas em abelhas expostas apenas a piraclostrobina e a associação dos agrotóxicos; enquanto as enzimas *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like*, *rab s geranylgeranyltransferase component A1*, *glutathione peroxidase*, *thioredoxin domain-containing 9*, *farnesol dehydrogenase-like* e *prophenoloxidase* apresentaram redução de expressão em abelhas expostas ao fipronil e a associação dos agrotóxicos.

Poucos estudos tem analisado o efeito de agrotóxicos sobre o sistema antioxidante das abelhas; entretanto, diferentes respostas têm sido demonstradas em função da idade das abelhas e da sua exposição a agrotóxicos ou moléculas naturais (Derecka et al. 2013; Du Rand et al., 2015, Słowińska et al., 2015; Du Rand et al., 2017). Derecka et al. (2013) demonstraram aumento da expressão gênica de enzimas que atuam na detoxicação em larvas de abelhas expostas ao inseticida imidaclopride. Słowińska et al. (2015) demonstraram redução da capacidade antioxidante total em abelhas recém-emergidas expostas ao inseticida imidaclopride, o que aumenta sua susceptibilidade ao estresse oxidativo nesse período. Em abelhas adultas com 30 dias esse comprometimento não foi observado (Słowińska et al., 2015). Du Rand et al. (2015) demonstraram aumento da expressão de enzimas antioxidantes em abelhas recém-emergidas; e em larvas (Du Rand et al., 2017) expostas a nicotina. Em geral, os resultados do presente estudo sugerem aumento da susceptibilidade de abelhas nutrízes ao estresse oxidativo, corroborando com os resultados apresentados por Słowińska et al. (2015).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento da geração de ROS e/ou pela redução da atividade fisiológica de enzimas que atuam como antioxidantes (Poljšak & Fink, 2014). Alguns agrotóxicos podem atuar como prooxidantes por prejudicar o funcionamento do sistema antioxidante (Rahal et al., 2014). Destaca-se que o genoma das abelhas apresenta menor número de genes que codificam proteínas antioxidantes em comparação ao genoma de outros insetos (Corona & Robinson, 2006). Portanto, a redução da expressão de proteínas antioxidantes em abelhas expostas a agrotóxicos pode representar uma barreira adicional para defesa desses insetos contra ROS que são geradas constantemente pelo metabolismo do oxigênio (Corona et al., 2005, Corona & Robinson 2006; Nikolic et al., 2015). A redução de enzimas que atuam como antioxidantes observada no presente estudo sugere que abelhas nutrízes expostas a piraclostrobina e ao

fipronil podem apresentar maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, que pode ocasionar danos a macromoléculas (Le Bourg, 2001), oxidação do DNA e RNA, peroxidação de membranas lipídicas (Michiels et al., 1994; Felton, 1995; Felton & Summers, 1995), redução do desenvolvimento de glândulas e da longevidade (Le Bourg, 2001). O aumento do estresse oxidativo em abelhas nutrízes expostas ao fipronil e a piraclostrobina pode ter contribuído para redução do desenvolvimento de glândulas mandibulares e hipofaríngeanas observado em estudos anteriores (Zaluski et al., dados não publicados). Destaca-se que a manutenção de altos níveis de enzimas antioxidantes em insetos e outros organismos tem sido relacionada à redução de danos em proteínas e ao aumento da sobrevivência das células, retardo do envelhecimento e da ocorrência de doenças relacionadas à idade e ao aumento da longevidade (Arking et al., 2000; Melov et al., 2000; Sohal & Weindruch, 1996; Vaanholt et al., 2008; Radyuk et al., 2010).

Genes associados ao sistema antioxidante em abelhas usadas na polinização em estufas também apresentaram redução de expressão, sugerindo redução da capacidade de defesa contra ROS e aumento do estresse oxidativo em abelhas (Morimoto et al., 2011). A enzima *superoxide dismutase [Cu-Zn]* (SOD 1) representa a primeira linha de defesa dos organismos contra as ROS produzidos na mitocôndria. Especificamente, esta enzima atua no citoplasma e converte radicais superóxidos a oxigênio e peróxido de hidrogênio, que é decomposto pela ação de catalases ou peroxiredoxinas, como a *peroxiredoxin 1* (Corona & Robinson 2006). O aumento da expressão de algumas enzimas antioxidantes que incluem isoformas da *superoxide dismutase* (Müller et al., 2007) e principalmente de enzimas pertencentes à classe das glutatíonases (GSTs) é associado ao aumento da resistência de insetos a agrotóxicos (Enayati et al., 2005; Lumjuan et al., 2011). Dessa forma a redução da expressão dessas enzimas em abelhas nutrízes expostas a agrotóxicos pode aumentar sua sensibilidade a essas moléculas. Destaca-se também a redução da expressão da enzima *prophenoloxidase* (PO) em abelhas nutrízes expostas ao fipronil e a associação de fipronil e piraclostrobina, entretanto, sem demonstrar um efeito sinérgico ou aditivo, o que sugere que o fipronil é diretamente responsável pelo decréscimo da sua expressão. A enzima PO é relacionada ao sistema imune das abelhas, responsável pela ativação da melanogênese em invertebrados (Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012; Zhu et al., 2017) que é fundamental na defesa contra bactérias, fungos e vírus (Gonzalez-Santoyo & Cordoba-Aguilar, 2012); portanto, a redução da sua expressão em

abelhas nutrízes expostas ao fipronil pode prejudicar sua defesa contra microorganismos, aumentando sua susceptibilidade a doenças. Zhu et al. (2017) demonstraram que a atividade da PO pode ser reduzida em abelhas após a exposição a mistura de agrotóxicos.

Em relação a proteínas envolvidas em processos de biossíntese e que apresentaram down-regulação em abelhas nutrízes expostas a piraclostrobina e ao fipronil destacam-se as proteínas: *prostaglandin E synthase 3* (EC 5.3.99.3); *pyridoxamine 5'-phosphate oxidase* (EC 1.4.3.5); *glutamine synthetase 2 cytoplasmic isoform X1* e *glutamine synthetase 2 cytoplasmic* (EC 6.3.1.2) envolvidas na biossíntese de glutamina e arginina; *6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase* (EC 4.2.3.12) envolvida na biossíntese de folato; *alanine aminotransferase 1* (EC 2.6.1.2) envolvida na biossíntese de arginina e *hydroxyacylglutathione mitochondrial isoform X1* (EC 3.1.2.6) envolvida na biossíntese de glutatona. A redução da expressão da proteína *prostaglandin E synthase 3* pode reduzir a biossíntese de prostaglandinas que desempenham importantes funções na reprodução, modulação da secreção de fluídos em glândulas e na resposta imune dos insetos (Stanley & Kim, 2011). A enzima *pyridoxamine 5'-phosphate oxidase* é envolvida na síntese *de novo* de piridoxina e piridoxal fosfato que é encontrada na geleia real, sendo essencial para o desenvolvimento das larvas (Brodschneider & Crailsheim, 2010). A glutamina é convertida a glutamato que é essencial a biossíntese de glutatona e permite o funcionamento de enzimas pertencentes à classe das glutatonas (GSTs), síntese de poliaminas que interagem com o DNA/RNA e atuam na biossíntese de proteínas (Du Rand et al., 2015). A redução da expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de glutamina e glutatona refletem a diminuição da expressão de enzimas GSTs observadas nas abelhas expostas ao fipronil e a piraclostrobina, indicando redução indireta da sua capacidade de detoxicação.

A redução da expressão das proteínas *protein-L-isoaspartate O-methyltransferase* (EC 2.1.1.77) e *S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase* (EC 2.4.2.28) relacionadas ao metabolismo de cisteína e metionina; *alanine aminotransferase 1* (EC 2.6.1.2), *glutamine synthetase 2 cytoplasmic isoform X1* e *glutamine synthetase 2 cytoplasmic* (EC 6.3.1.2) relacionadas ao metabolismo da alanina, aspartato e glutamato (exceto *alanine aminotransferase 1* para piraclostrobina) também suportam a hipótese de redução da capacidade de detoxicação. Em geral, o catabolismo de aminoácidos que ocorre na presença de agentes estressores contribui para geração de energia e pode gerar

intermediários do ciclo de Krebs que são usados como precursores para síntese de moléculas como a glutatona que atua na detoxicação (Du Rand et al., 2015).

As proteínas *ubiquitin-60S ribosomal L40*, *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I*, *elongation factor 1-gamma* e *tyrosine--tRNA ligase* apresentaram redução de expressão em abelhas expostas isoladamente e a associação dos agrotóxicos. A enzima *U3 small nucleolar RNA-associated 4 homolog A* apresentou redução de expressão em abelhas expostas ao fipronil e a associação dos agrotóxicos; enquanto a proteína *eukaryotic initiation factor 4A-I* apresentou redução de expressão em abelhas expostas a associação dos agrotóxicos. Essas proteínas apresentam importantes funções relacionadas a processos de tradução e/ou transporte de RNA (Kanehisa & Goto, 2000) e a redução de sua expressão sugere comprometimento da síntese proteica em abelhas expostas a agrotóxicos.

As proteínas *hsp70-binding 1*, *10 kda heat shock mitochondrial*, *profilin*, *t-complex 1 subunit eta* e *60 kda heat shock mitochondrial-like* que apresentam funções de ligação a proteínas, atuando como chaperonas ou em processos de enovelamento de proteínas que são essenciais para garantir sua função biológica, apresentaram redução de expressão em todos grupos expostos a agrotóxicos. Esses resultados sugerem que enzimas com funções essenciais para conformação e adequado funcionamento de outras proteínas podem ser afetadas pela exposição das abelhas a agrotóxicos. A profilina se liga a actina e apresenta importante função estrutural. A proteína *60 kda heat shock mitochondrial-like* atua no enovelamento de proteínas, processamento da informação genética e do RNA, garantindo o *turnover* das moléculas de RNA, processo que é crítico para expressão da informação genética (Kanehisa & Goto, 2000).

A expressão da proteína *odorant-binding protein 14* (OBP14) foi reduzida em todos os tratamentos expostos aos agrotóxicos. Proteínas odorantes são requeridas para reconhecimento de estímulos químicos pelo sistema olfatório dos insetos (Leal, 2013) e a redução da sua expressão pode prejudicar a percepção de estímulos pelas abelhas nutrízes, prejudicando sua função na colônia. As proteínas *14-3-3 epsilon* e *14-3-3 zeta*, associadas à aprendizagem e formação de memória em insetos (Skoulakis & Davis, 1996; Zheng et al., 2011), também apresentaram redução de expressão todos os tratamentos expostos aos agrotóxicos, sugerindo comprometimento dessas funções.

Houve um pequeno número de proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos e síntese de energia [*malic enzyme* (EC 1.1.1.40), *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit mitochondrial* (EC 1.2.4.1), *pyruvate kinase* (EC 2.7.1.40)] e a síntese proteica (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K*) que apresentaram aumento de expressão em abelhas expostas aos agrotóxicos (Tabela suplementar 2). Destaca-se o aumento da expressão das proteínas *heat shock 70 kda cognate 5*, *heat shock 70 kda 4 isoform X1* e *heat shock 70 kda cognate 3* que são pertencentes à família das *Heat Shock Proteins* (HSPs). Essas proteínas são marcadores celulares de resposta ao estresse e o aumento da expressão dessas proteínas em insetos expostos a agrotóxicos foi observado em estudos realizados anteriormente (Nazir et al., 2001; Smodiš Škerk & Gregorc 2010). Essas proteínas podem prevenir a apoptose celular, impedir a desnaturação de proteínas e promover a degradação de proteínas anormais (Bierkens, 2000). Além disso, duas isoformas da proteína *lethal (2) essential for life-like* que são relacionadas à família das HSPs e apresentam função de chaperonas apresentaram aumento de expressão em abelhas expostas aos agrotóxicos. Estudos realizados por Roat et al. (2014) demonstraram aumento da proteína *lethal (2) essential for life-like* em abelhas expostas ao fipronil. Sugere-se que o aumento de HSPs e de proteínas chaperonas pode estar relacionado à ação citotóxica do fipronil (Roat et al., 2014) e ao possível dano a estrutura das proteínas ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo em abelhas expostas aos agrotóxicos.

A redução da expressão de proteínas pertencentes à família das *Major Royal Jelly Proteins*, bem como de proteínas associadas ao metabolismo de energia, sistema antioxidante, detoxicação, processos de biossíntese, metabolismo de aminoácidos, transcrição e tradução, sistema olfatório, aprendizagem e memória caracterizam novos efeitos associados à exposição de abelhas nutrízes ao fungicida piraclostrobina, inseticida fipronil e suas associações. Em conjunto, essas alterações demonstram que a exposição das abelhas nutrízes a doses ambientalmente relevantes desses agrotóxicos pode causar alterações em processos vitais para execução de suas funções na colônia, comprometendo o funcionamento de glândulas responsáveis pela síntese de geleia real, olhos/ocelos, antenas e cérebro. As alterações encontradas no presente estudo demonstraram potencial comprometimento da nutrição da colônia; aumento da susceptibilidade das abelhas a patógenos, agrotóxicos e ao estresse oxidativo devido ao comprometimento da expressão

de proteínas associadas à imunidade, detoxicação e de defesa contra ROS; bem como comprometimento da percepção de estímulos, aprendizagem e memória.

Esses resultados sugerem que a exposição das abelhas a agrotóxicos pode contribuir para o declínio das suas populações, devido ao comprometimento de vias metabólicas e processos vitais, como exemplificados para o fipronil, piraclostrobina e suas associações. Avaliações mais detalhadas dos efeitos ocasionados pela exposição das abelhas a doses ambientalmente relevantes de agrotóxicos são necessárias a fim prevenir a ocorrência de alterações que podem comprometer a manutenção desses polinizadores. A redução do uso de agrotóxicos com a adoção de estratégias que incluem o Manejo Integrado de Pragas e de controle biológico se tornam fundamentais para reduzir a exposição das abelhas e de outras espécies não alvo a essas moléculas. Destaca-se que as alterações observadas no presente estudo certamente não se restringem as abelhas, sendo que o declínio global de outros polinizadores e organismos pode estar relacionado a disfunções ocasionadas pela sua exposição a agrotóxicos, que podem agir como catalizadores para extinção de muitas espécies.

Métodos

Fornecimento de dieta contaminada, coleta de abelhas nutrízes e confirmação de resíduos de agrotóxicos

As abelhas utilizadas no presente estudo foram provenientes de colônias de abelhas *Apis mellifera* Africanizadas, mantidas no apiário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. As colônias não apresentavam doenças ou parasitas e não receberam nenhum tratamento químico. Todos os procedimentos para obtenção das abelhas e exposição aos agrotóxicos foram realizados como previamente descrito (Zaluski et al., dados não publicados).

Abelhas recém-emergidas (<10 h) de cinco colônias doadoras foram marcadas no tórax com tinta atóxica (Marcador Posca, Mitsubishi, Japão) utilizando diferentes cores (uma cor para designar as abelhas de cada colônia doadora). Depois de marcadas, aproximadamente 100 abelhas de cada colônia doadora foram introduzidas em núcleos experimentais, onde receberam as dietas contaminadas. Todos os núcleos possuíam rainhas-irmãs, naturalmente acasaladas, com quatro meses de idade. Todos os favos

contendo pólen foram removidos e coletores de pólen foram instalados na entrada dos núcleos experimentais 24 h antes da introdução das abelhas marcadas para garantir que as abelhas introduzidas tivessem acesso apenas às dietas contaminadas. Todos os núcleos receberam xarope de mel 50 % (mel: água) *ad libitum*.

As dietas foram preparadas utilizando mel e pólen polifloral orgânicos (Breyer & Cia Ltda, União da Vitória, Brasil). Soluções estoque das formulações comerciais de piraclostrobina (Comet[®] 250 g i.a. L⁻¹; Basf Schwarzheide GmbH, Schipkauer Strasse, Schwarzheide, Alemanha); e de fipronil (Regent 800WG[®] 800g i.a. kg⁻¹; Basf Agri-Produção SAS, Saint Aubin Les Elbeuf, Cleon, França) foram preparadas, sendo diluídas em água destilada. A concentração final de cada agrotóxico na dieta contaminada fornecida as abelhas (piraclostrobina: 850 ppb; fipronil: 2,5 ppb; piraclostrobina + fipronil: 850 ppb + 2,5 ppb) foi obtida com a adição de quantidade apropriada de piraclostrobina e fipronil a xarope de mel (50%), que foi adicionado ao pólen em proporção de 3:1 (pólen:xarope de mel). As concentrações de piraclostrobina e fipronil utilizadas no presente estudo foram selecionadas visando expor as abelhas a dietas contendo esses agrotóxicos em condições próximas a que ocorrem naturalmente em campo. A piraclostrobina foi detectada no pólen de diferentes origens em quantidade médias de $2.787,1 \pm 1.890,1$ ppb (Pettis et al., 2013); 10.458 e 267 ppb (Frazier et al., 2015) e no *beebread* em quantidades entre 319-2.170 ppb (Yoder et al., 2013). Já o inseticida fipronil foi detectado em pólen em quantidades próximas a 2.5 ppb (Bernal et al., 2010; Stoner & Eitzer, 2013; European Food Safety Authority, 2013).

O pólen e o xarope foram homogeneizados para formar uma pasta que foi fracionada em porções de 100g e mantida em freezer a -20 °C até a utilização. As pastas de pólen fornecidas ao grupo controle (sem contaminação) foram preparadas da mesma maneira. Cada núcleo experimental recebeu 100 g de uma das pastas de pólen diariamente sobre os quadros de cria, durante seis dias para garantir que as abelhas marcadas introduzidas nos núcleos consumissem as dietas contaminadas *ad libitum* desde sua introdução até o 6º dia, quando são denominadas nutrizes e produzem maior quantidade de geleia real (Deseyn & Billen, 2005; Landim, 2009; Feng et al., 2009; Peters et al., 2010). No sétimo dia aproximadamente 300 abelhas marcadas de cada núcleo experimental foram coletadas, anestesiadas em gelo seco e triadas em função da

origem da colônia doadora. As abelhas foram decapitadas e as amostras armazenadas a -80 °C até a realização das análises proteômicas.

A confirmação da presença dos agrotóxicos nas pastas foi realizada utilizando procedimento de extração dos resíduos por QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) modificado, seguido de determinação dos resíduos (piraclostrobina, fipronil, *fipronil sulfone*, *fipronil desulfinyl*, *fipronil sulfide* e *fipronil amide*) por UHPLC/MS-MS, conforme descrito previamente (Zaluski et al., dados não publicados). O limite de detecção (LOD) para todos os resíduos foi de 1,5 ppb. Não foram encontrados resíduos de pesticidas nas pastas do grupo controle. A quantidade média de piraclostrobina detectada foi de 870 ± 53 ppb. Não foram detectados resíduos de fipronil e de seus metabólitos dentro dos limites de detecção utilizados. A não detecção do fipronil possivelmente se deve a dose selecionada para testar seu efeito em condição próxima à exposição das abelhas a esse inseticida em campo (2,5 ppb) e a sua provável degradação, que pode ter reduzido a quantidade de fipronil e gerado níveis baixos de metabólitos que impediram sua detecção dentro do LOD disponível.

Processamento das amostras e corridas eletroforéticas

Para a extração das proteínas, foi utilizado um *pool* de 60 cabeças de abelhas nutrizas (12 de cada colônia doadora). As amostras foram lavadas com ácido acético (1 %) para remoção de impurezas e enxaguadas em abundância com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em microtubos com *beads* de zircônia (2,8 mm) e 1 mL de água ultrapura gelada e homogeneizadas no equipamento Omni Bead Ruptor em velocidade máxima por 60 segundos. Após, as amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos e o processo de homogeneização foi repetido. O processo de extração utilizando água ultrapura foi adaptado de Cavecci et al. (2015) e teve por objetivo maximizar a extração de proteínas hidrossolúveis, que incluem proteínas da geleia real (Simuth, 2001) e enzimas antioxidantes. O homogeneizado foi centrifugado a 7.000 rpm por 15 min (4 °C) com coleta do sobrenadante, seguido de duas etapas adicionais de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos (4 °C), a fim de limpar o extrato proteico. Finalmente, o sobrenadante foi filtrado em um filtro de seringa (0,46 µm) e precipitado com acetona gelada (80 %) em proporção 1:4 (amostra:acetona); as amostras foram mantidas em geladeira por 2 h. Após a precipitação, os extratos foram centrifugados a

14.000 rpm por 5 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi removido. O precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com acetona gelada (Cavecci et al., 2015). Uma parte dos *pellets* proteicos obtidos foi utilizada para quantificação total das proteínas e outra para as separações eletroforéticas. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o kit Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando albumina sérica bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectrophotometer Evolution 60 Thermo Fisher Scientific, USA) em comprimento de onda de 595 nm.

Os *pellets* proteicos utilizados nas corridas eletroforéticas foram ressuspensos em solução contendo ureia 7 mol L⁻¹; tiourea 2 mol L⁻¹; CHAPS [3-((3-colamidopropil) dimetilamônio)-1-propanossulfonato] 2 % (m/v); anfólitos com pH de 3–10 0,5 % (v/v), azul de bromofenol 0,002 % (m/v) e 1,4-ditiotreitol (DTT) (2,8 mg DTT: 1 mL solução). Em seguida, alíquotas de 250 µg de proteínas obtidas para cada tratamento foram aplicadas individualmente em fitas de 13 cm contendo anfólitos de pH 3–10 para isoeletrofocalização. As corridas eletroforéticas foram realizadas em duplicata, utilizando proteínas extraídas de duas réplicas para cada grupo experimental, totalizando 04 géis por tratamento. As fitas foram mantidas em aparato (IPG Box) por 14 h em temperatura ambiente para permitir sua reidratação. Após esse período, as fitas hidratadas foram introduzidas no sistema de isoeletrofocalização (Ettan™ IPGphor™, GE Healthcare Life Sciences) para separação das proteínas de acordo com seu pI, perfazendo um total de 15.504 Vh.

Posteriormente, as fitas foram equilibradas em duas etapas, com duração de 15 minutos cada: na primeira foram utilizados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002 % (m/v) e DTT 2% (m/v), com objetivo de manter as proteínas na sua forma reduzida; na segunda etapa, o DTT foi substituído por iodoacetamida (IAA) 2,5 % (m/v) para alquilação dos grupos tióis das proteínas e prevenção da sua reoxidação (Braga et al., 2017).

Na segunda etapa de separação das proteínas (2D PAGE), em função de sua massa molecular (Mm), as fitas foram aplicadas sobre um gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) preparado em placa com dimensões de 180 × 160 × 1,5 mm. Um padrão de proteínas (LWL Calibration Kit, GE Healthcare Life Sciences) com massa molecular

entre 14,4–97,0 kDa foi aplicado ao lado das fitas, e ambos foram selados com solução de agarose 0,5 % (m/v). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare Life Sciences) em duas etapas: 7,5 mA/gel por 30 min e 15 mA/gel por 2 h 10 min. Ao término da corrida, os géis foram fixados em ácido acético 10 % (v/v) e etanol 40 % (v/v) por uma hora; em seguida os géis foram corados com Coomassie coloidal [sulfato de amônio 8 % (m/v); ácido fosfórico 1,6 % (v/v); *Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,08 % (m/v); metanol 25% (v/v)] por 72 h. O corante foi removido do gel com sucessivas lavagens, utilizando água ultrapura para revelação das proteínas.

Após a remoção do corante, os géis foram escaneados utilizando o equipamento ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) em resolução 300 dpi e *zoom* 100%, selecionados a partir das recomendações do fabricante. As imagens foram processadas no programa *ImageMaster Platinum*, versão 7.0 (GE Healthcare Life Sciences) para obtenção do número de *spots*, porcentagem de correlação entre os géis (*matching*), pI, volume e Mm dos *spots*. Os parâmetros utilizados para detecção automática dos *spots* foram: *saliência*: 20; *smooth*: 03 e área mínima: 05. O contraste das imagens dos géis foi ajustado para permitir a melhor visualização dos *spots*.

Análises da diferença de expressão dos *spots* proteicos

A expressão dos *spots* proteicos das abelhas do grupo controle foi comparada com a expressão dos *spots* das abelhas expostas aos agrotóxicos piraclostrobina, fipronil e piraclostrobina + fipronil, utilizando o programa ImageMaster Platinum, versão 7.0 (GE Healthcare Life Sciences), com análise de quatro géis para cada grupo experimental. O volume normalizado (%V) de cada *spot* proteico obtido nos géis do grupo controle foi utilizado para determinar diferenças significativas entre *spots* proteicos dos grupos expostos aos agrotóxicos por meio de análise de variância (ANOVA); o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Caracterização dos *spots* proteicos por ESI-MS/MS e análise de bioinformática

Os *spots* proteicos com diferença de expressão foram extraídos dos géis e processados para identificação das proteínas por ESI-MS/MS. Os *spots* foram fragmentados em segmentos com aproximadamente 1 mm³, descoloridos, reduzidos, alquilados, submetidos a digestão trípica e os peptídeos foram eluídos de acordo com

procedimentos descritos por Shevchenko et al. (2006). As soluções contendo os peptídeos foram analisadas utilizando sistema nanoACQUITY UPLC – acoplado ao espectrômetro de massas Xevo QToF G₂ (Waters, Manchester, UK) com fonte de ionização por electrospray (ESI). O Servidor *Protein Lynx Global* (PLGS) versão 3.0 foi usado para processar e pesquisar os dados gerados pelo LC-MS^E, definindo carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metioninas como modificação variável. A tolerância máxima de erro foi de 10 ppm (Cavecci et al., 2015; Braga et al., 2017).

A identificação das proteínas e o valor do seu *score* foram obtidos por meio de busca no banco de dados de *Apis mellifera* (UniProtKB/Swiss-Prot) usando o algoritmo incorporado ao software. O pI e a Mw experimentais das proteínas foram obtidos no software Platinum ImageMaster a partir da análise dos géis. O pI e a Mw teóricos foram obtidos no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot, utilizando o código de acesso de cada proteína. A cobertura das proteínas indica a porcentagem dos resíduos das sequências que foram identificadas pelo espectrômetro para cada proteína. Sequências FASTA foram obtidas no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot e importadas para o programa *Blast2GO* onde foi realizada a anotação funcional das proteínas utilizando a similaridade das sequências com base no Gene Ontology (GO) e sua separação em três níveis (componente celular, função molecular e função biológica) (Conesa & Gotz, 2008). A busca por vias metabólicas foi conduzida no banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) com indicação do *EC number* (*Enzyme Commission Number*) para confirmar as reações químicas catalisadas pelas enzimas que apresentaram alteração na expressão (Kanehisa & Goto, 2000).

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (processo nº: 165696/2014-1).

Referências

Anke, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Can. J. Bot.* **73**, 940-945 (1995).

Arking, R. *et al.* Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Exp. Gerontol.* **35**, 167-185 (2000).

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman (2002).

Bernal, J. *et al.* Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J. Econ. Entomol.* **103**, 1964-1971 (2010).

Bierkens, J. G. E. A. Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. *Toxicol.* **153**, 61-72 (2000).

Braga, C. *et al.* Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 414-422 (2017).

Brodschneider, R. & Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**, 278-294 (2010).

Buttstedt, A., Moritz, R. F. A. & Erler S. More than royal food - major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Front. Zool.* **10**, 1-10 (2013).

Buttstedt, A., Moritz, R. F. A. & Erler, S. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biol. Rev.* **89**, 255-269 (2014).

- Cavecci, B. *et al.* Metalloproteomic profile determination of muscle samples from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using AAS and ESI-MS/MS after 2D-PAGE separation. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 239-246 (2015).
- Chan, D. W. & Schwartz, M. K. Tumor markers: introduction and general principles in *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications* (ed. Diamandis, E. P.) 9-18 (Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2002).
- Chauzat, M. P. *et al.* A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France *J. Econ. Entomol.* **99**, 253-262 (2006).
- Chauzat, M-P., *et al.* An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* **30**, 103-111 (2011).
- Colwell, M. J., Williams, G. R., Evans, R. C. & Shutler, D. Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and pesticide exposure. *Ecol. Evol.* doi: 10.1002/ece3.3178 (2017).
- Conesa, A. & Gotz, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int. J. Plant Genomics* **2008**, 619832 (2008).
- Corona, M. & Robinson, G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.* **15**, 687-701 (2006).
- Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B. & Robinson, G. E. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1230-1238 (2005).
- Crailsheim, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **29**, 97-112 (1998).

David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Goulson, D. & Hill, E. M. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8151–8162.

DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y. & Simonds, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* **4**, 71-89 (2013).

Derecka, K. *et al.* Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *Plos One* **8**, e68191 (2013).

Deseyn, J. & Billen, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* **36**, 49-57 (2005).

Du Rand, E. E. *et al.* Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* **5**, 11779 doi: 10.1038/srep11779 (2015).

Du Rand, E. E. *et al.* Proteomic and metabolomic analysis reveals rapid and extensive nicotine detoxification ability in honey bee larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **82**, 41-51. (2017).

Enayati, A. A., Ranson, H. & Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect. Mol. Biol.* **14**, 3-8 (2005).

European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA J.* **3158**, 1-51 (2013).

Felton, G. W. & Summers, C. B. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 187-197 (1995).

Feng, M., Fang, Y. & Li, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics* **10**, 645 (2009).

Frazier, M. T. *et al.* Assessing honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging populations and the potential impact of pesticides on eight U.S. crops. *J. Econ. Entomol.* **108**, 2141-2152 (2015).

Gonzalez-Santoyo, I. & Cordoba-Aguilar, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.*, **142**, 1-16 (2012).

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1255957 (2015).

Graves, P. R. & Haystead, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**, 39-63 (2002).

Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M. & Ellis, J.D. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.* **58**, 1042-1049 (2012).

Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E., Guedes, N. M. P., Ribeiro, B. & Serrao, J. E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiol. Entomol.* **31**, 30-38 (2006).

Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B. & Glenn, T. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.* **95**, 28-35 (2002).

Han, B., Zhang, L., Feng, M., Fang, Y. & Li, J. K. An integrated proteomics reveals pathological mechanism of honeybee (*Apis cerana*) sacbrood disease. *J. Proteome Res.* **12**, 1881-1897 (2013).

Hatjina, F. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* **44**, 467-480 (2013).

Heylen, H., Gobin, B., Arckens, L., Huybrechts, R. & Billen, J. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **42**, 103-116 (2011).

Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931-949 (2006).

Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A. & Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, **41**, 312-331 (2010).

Kairo, G. *et al.* Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci. Rep.* **6**, 31904 (2016).

Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27-30 (2000).

Kevan, P. G. & Phillips, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. *Conserv. Ecol.* **5**, 1-17 (2001).

Kliot, A. & Ghanim, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* **68**, 1431-1437 (2012).

Krishna, R. G. & Wold, F. Identification of common post-translational modifications in *Protein structure: a practical approach* (ed. Creighton T. E.) 91-116 (Oxford University Press, 1997).

Landim, C. C. Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. (Editora UNESP, 2009).

Lane, N. & Martin, W. The energetics of genome complexity. *Nature* **467**, 929-934 (2010).

Le Bourg, E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* **498**, 183-186 (2001).

Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 373-391 (2013).

Lumjuan, N. *et al.* The role of the *Aedes aegypti* epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 203-209 (2011).

Mao, W., Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* **114**, 2538-2543 (2017).

Mehaffy, C. *et al.* Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* **10**, 1966-1984 (2010).

Melov, S. *et al.* Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**, 1567-1569 (2000).

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. & Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 235-248 (1994).

Morimoto, T. *et al.* The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. *Ecol. Evol.* **1**, 201-217 (2011).

- Müller, P., Donnelly, M. J. & Ranson, H. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* **2007**, 8:36 (2007).
- Mullin, C. A. *et al.* High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *Plos One* **5**, e9754 (2010).
- Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1-13 (2009).
- Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D. K. & Chowdhuri D. K. Chlorpyrifos-induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 443-449 (2001).
- Nicodemo, D. *et al.* Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 2070-2075 (2014).
- Nikolic, T. V., Purac, J., Orcic, S. & Kojic, D. Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **90**, 181-194 (2015).
- Parker, C. E., Mocanu, V., Mocanu, M., Dicheva, N. & Warren, M. R. Mass spectrometry for post-translational modifications in *Neuroproteomics* (ed. Alzate, O.) 9-18 (CRC Press/Taylor & Francis, 2010).
- Peters, L., Zhu-Salzman, K. & Pankiw, T. Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **56**, 132-137 (2010).
- Pettis J. S. *et al.* Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *Plos One* **8**, e70182 (2013).

Pontes, M. H., Sevostyanova, A. & Groisman, E. A. When too much ATP is bad for protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **427**, 2586-2594 (2015).

Potts, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 345-353 (2010).

Potts, S. G. *et al.* Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* **540**, 220-229 (2016).

Radyuk, S.N. *et al.* Mitochondrial peroxiredoxins are critical for the maintenance of redox state and the survival of adult *Drosophila*. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1892-1902 (2010).

Roat, T. C. *et al.* Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology*, **23**, 1659-1670 (2014).

Sandrock, C. *et al.* Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *Plos One* **9**, e103592 (2014).

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860 (2006).

Simuth, J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie* **32**, 69-80 (2001).

Sizova, D. Protein expression profile of alzheimer's disease mouse model generated by difference gel electrophoresis (DIGE) approach in *Genomics, proteomics, and the nervous system* (ed. Clelland, J. D.) 489-510 (Springer-Verlag, 2011).

Skoulakis, E. M. & Davis, R. L. Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron*. **17**, 931-944 (1996).

Słowińska, M. *et al.* Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticide, and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie* **47**, 227-236 (2016).

Smodiš Šker, M. I. & Gregorc, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* **41**, 73-86 (2010).

Stanley, D. & Kim, Y. Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Front. Endocrinol.* **2**, 1-11 (2011).

Stoner K. A. & Eitzer, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *Plos One* **8**, e77550 (2013).

The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158-D169 (2017).

Traynor, K. S. *et al.* In-hive pesticide exposome: assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Sci. Rep.* **6**, 33207 (2016).

Vaanholt, L. M., Speakman, J. R., Garland Jr., T., Loble, G. E. & Visser, G. H. Protein synthesis and antioxidant capacity in aging mice: effects of long-term voluntary exercise. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 148-157 (2008).

Van Veen, J. W. Biology of honeybees and stingless bees in *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security* (ed. Gupta, R. K. *et al.*) 105-123 (Springer, 2014).

Vezeteu, T. V., Bobiș, O. Moritz, R. F. A. & Buttstedt, A. Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *Microbiologyopen* **6**, e00397 (2017).

Wolstedji, D. *et al.* Proteome analysis of hemolymph changes during the larval to pupal development stages of honeybee workers (*Apis mellifera ligustica*). *J. Proteome Res.* **12**, 5189-5198 (2013).

Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L. & Goulson, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* **336**, 351-352 (2012).

Yoder, J. A. *et al.* Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *J. Toxicol. Environ. Health, A* **76**, 587-600 (2013).

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. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 1062-1069 (2015).

Zhang, Y., Zhang, G., Huang, X. & Han, R. Proteomic analysis of *Apis cerana* and *Apis mellifera* larvae fed with heterospecific royal jelly and by CSBV challenge. *Plos One* **9**, e102663 (2014).

Zheng, A. *et al.* Proteomic analysis of honeybee (*Apis mellifera* L.) pupae head development. *Plos One* **6**, e20428 (2011).

Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J. & Luttrell, R. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *Plos One* **12**, e0176837 (2017).

.....

Tabela Suplementar 1. Identificação dos spots proteicos que apresentaram redução de expressão (ANOVA; $p < 0,05$) em abelhas nutrízes expostas por seis dias ao inseticida fipronil (F) e fungicida piraclostrobina (P), de forma isolada e em associação (PF). A análise de expressão dos spots foi realizada utilizando o programa *ImageMaster Platinum*, tendo como referência o proteoma de abelhas não expostas a agrotóxicos (controle) com identificação das proteínas por ESI-MS/MS. Valores negativos (-) indicam potencial redução de expressão das proteínas. O sinal Ø demonstra ausência do spot nos grupos expostos aos agrotóxicos, sendo que nesse caso as proteínas foram identificadas apenas no grupo controle. Proteínas que apresentam mais de uma função são apresentadas repetidamente.

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
Major Royal Jelly Proteins (MRJPs)										
02	Ø	Ø	Ø	Major royal jelly protein 1	O18330	4673.20	4.63/41.157	5.10/48.886	33.56	caste determination, influence by environmental factors; defense response to fungus; defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium; killing of cells of other organism
03	Ø	Ø	Ø			7974.65	4.74/48.757		45.14	
04	Ø	Ø	Ø			1009.55	5.36/50.976		10.65	
05	Ø	Ø	Ø			12723.76	5.24/133.690		58.56	
06	Ø	Ø	Ø			8356.32	5.17/136.100		48.84	
15	-1.68	-1.78	-2.19			3615.26	5.39/26.334		32.41	
24	-2.40	-1.45	-2.50			1320.00	6.77/39.214		42.36	
28	-1.98	-2.27	-2.54			2033.81	7.27/45.000		44.68	
32	-1.33	-1.08	-1.73			4900.29	6.54/57.427		58.8	
33	-1.60	1.85	-2.47			6943.43	8.46/63.974		55.56	
34	-1.15	-1.14	-1.70			12725.02	5.60/66.472		79.63	
36	-1.09	–	-1.56			1296.31	6.95/56.980		50.23	
49	–	-1.07	-2.05			6710.26	8.26/59.726		54.86	
60	–	–	Ø			9309.71	5.92/56.223		69.21	

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
12	-1.00	-1.01	-1.15	Major royal jelly protein 2	O77061	466.72	4.90/18.909	6.83/51.074	33.41	—
18	-1.74	-1.74	-2.00			1980.23	7.12/33.170		30.53	—
29	-1.28	-2.29	-2.57			13689.63	7.29/45.000		50.22	—
36	-1.09	—	-1.56			17707.96	6.95/56.980		76.55	—
37	-1.11	—	Ø			1295.67	4.75/57.746		23.89	—
44	—	-1.17	-1.46			4160.62	4.74/29.021		35.40	—
49	—	-1.07	-2.05			6554.41	8.26/59.726		55.75	—
33	-1.60	-1.85	-2.47	Major royal jelly protein 2	A0A088AU22	1766.85	8.46/63.974	8.07/47.553	14.53	—
29	-1.28	-2.29	-2.57	Major royal jelly protein 2	A0A088AU25	11164.63	7.29/45.000	5.67/37.105	44.79	—
36	-1.09	—	-1.56			13279.21	6.95/56.980		68.10	—
29	-1.28	-2.29	-2.57	Major royal jelly protein 2	A0A088AU26	13798.74	7.29/45.000	6.60/ 53.797	52.73	—
44	—	-1.17	-1.46			4125.76	4.74/29.021		30.67	—
36	-1.09	—	-1.56			17442.77	6.95/56.980		77.73	—
37	-1.11	—	Ø	Major royal jelly protein 2	A0A088AU27	8466.33	4.75/57.746	4.91/ 50.851	57.53	—
21	-1.80	-1.73	-2.22	Major royal jelly protein 4	Q17061	2095.66	5.50/37.782	5.89/ 52.915	24.35	—
34	-1.15	-1.14	-1.70			2367.30	5.60/66.472		36.21	—
60	—	—	Ø			458.67	5.92/56.223		9.05	—
03	—	—	Ø	Major royal jelly protein 5	O97432	1185.53	4.74/48.757	5.95/ 70.236	37.88	—
12	-1.00	-1.01	-1.15			285.40	4.90/18.909		34.88	—
32	-1.33	-1.08	-1.73			806.93	6.54/57.427		22.07	—
33	-1.60	-1.85	-2.47			1766.85	8.46/63.974		13.18	—
Carbohydrate metabolism and energy production										
03	Ø	Ø	Ø	Fructose-bisphosphate aldolase	A0A087ZPQ8	1087.87	4.74/48.757	8.33/41.713	40.31	fructose-bisphosphate aldolase activity

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
16	-2.46	-1.58	-2.65	Triosephosphate isomerase	A0A088ARS9	34491.68	8.68/28.711	7.84/13.702	88.98	gluconeogenesis; glycolytic process; pentose-phosphate shunt
58	Ø	-1.20	Ø			913.24	8.19/37.224		68.5	
19	-1.16	-1.43	-1.63	Arginine kinase	O61367	536.64	6.12/34.233	5.66/40.008	33.24	arginine kinase activity; ATP binding
55	Ø	–	Ø			340.07			19.44	
21	-1.80	-1.73	-2.22	Phosphoglycolate phosphatase-like	A0A087ZPT8	40227.95	5.50/37.782	5.15/34.139	83.39	phosphatase activity; hydrolase
02	Ø	Ø	Ø			3302.60	4.63/41.157		39.09	
17	-1.41	-1.09	-1.71	Phosphoglycerate mutase	A0A088A4K0	15387.60	7.80/33.107	9.36/ 35.361	74.36	bisphosphoglycerate mutase activity; phosphoglycerate mutase activity
45	–	-1.19	-1.38			303.42	4.45/36.630		15.38	
21	-1.80	-1.73	-2.22	Inorganic pyrophosphatase	A0A088ANF1	22059.11	5.50/37.782	6.57/37.661	76.2	inorganic diphosphatase activity; magnesium ion binding
23	-2.48	-2.52	-2.93	Arginine kinase	A0A088ARZ8	963.48	6.06/38.923	6.11/43.411	38.38	ATP binding; kinase activity
24	-2.40	-1.45	-2.50	Malate dehydrogenase	A0A087ZYQ1	7850.33	6.77/39.214	6.25/ 36.159	49.55	L-malate dehydrogenase activity
25	-1.92	-1.26	-1.95			1175.97	7.42/39.670		32.13	
30	-1.51	-1.32	-2.02	Aldose 1-epimerase	A0A087ZNJ7	200.41	6.66/46.632	5.95/42.255	5.97	aldose 1-epimerase activity; carbohydrate binding
33	-1.60	-1.85	-2.47	Glucose-6-phosphate isomerase	A0A087ZPV4	1730.46	8.46/63.974	7.73/62.967	54.94	glucose-6-phosphate isomerase activity
53	Ø	Ø	Ø	Phosphomannomutase	A0A088A245	3587.08	6.29/30.120	5.68/30.390	60.31	phosphomannomutase activity
20	-1.11	-1.21	-1.41	Transaldolase	A0A087ZPV0	3804.99	6.68/36.948	8.12/ 37.178	53.92	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glyceronetransferase activity
23	-2.48	-2.52	-2.93			1086.21	6.06/38.923		42.17	
24	-2.40	-1.45	-2.50			1085.61	6.77/39.214		40.96	
58	Ø	-1.20	Ø			120.95	8.19/37.224		16.87	

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
Antioxidant system										
11	-1.43	-1.63	-2.05	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	A0A088A933	11015.95	7.12/17.376	6.21/15.634	92.76	metal ion binding; superoxide dismutase activity
50	-1.07	–	Ø			5280.47	6.93/17.789		58.55	
14	-1.47	-1.21	-1.61	Peroxiredoxin 1	A0A087ZND2	742.39	7.41/25.657	5.65/ 21.787	31.96	peroxiredoxin activity
41	–	-1.68	-2.19			24167.89	6.30/22.151		81.44	
16	-2.46	-1.58	-2.65	Pyridoxamine 5 - phosphate oxidase	A0A088ASV9	723.35	8.68/28.711	8.41/30.041	31.23	FMN binding; pyridoxamine-phosphate oxidase activity
16	-2.46	-1.58	-2.65	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like	A0A088A500	223.44	8.68/28.711	8.56/28.776	44.49	alcohol dehydrogenase (NAD) activity
20	-1.11	-1.21	-1.41	Lambda-crystallin homolog	A0A087ZPK0	85.63	6.68/36.948	6.56/35.861	14.2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity
25	-1.92	-1.26	-1.95			12355.92	7.42/39.670		75.39	
20	-1.11	-1.21	-1.41	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase-like	H9K9P8	2652.83	6.68/36.948	6.07/36.899	52.57	oxidoreductase activity
22	-1.55	-1.60	-2.20	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	A0A087ZRH2	12268.41	6.97/37.929	5.39/ 31.172	89.74	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity; NAD binding
27	-1.18	-1.20	-1.45			2700.72	6.92/42.758		58.95	
47	–	-1.08	-1.51			257.85	6.93/85.626		20.70	
24	-2.40	-1.45	-2.50	Malate dehydrogenase	A0A087ZYQ1	7850.33	6.77/39.214	6.25/ 36.159	49.55	L-malate dehydrogenase activity
25	-1.92	-1.26	-1.95			1175.97	7.42/39.670		32.13	

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
25	-1.92	-1.26	-1.95	Aldose reductase-like	A0A088AGI8	10563.21	7.42/39.670	6.26/36.082	82.08	oxidoreductase activity
27	-1.18	-1.20	-1.45	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	A0A087ZRH1	3882.57	6.92/42.758	9.21/8.777	56.41	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity; NAD binding
29	-1.28	-2.29	-2.57	Probable medium-chain specific acyl-mitochondrial	A0A087ZTI9	7524.57	7.29/45.000	8.51/46.520	54.44	acyl-CoA dehydrogenase activity; flavin adenine dinucleotide binding
35	-1.11	–	-1.36	Glutathione S-transferase S1	C3VMN1	2591.21	9.66/29.021	8.77/23.762	39.22	transferase activity
35	-1.11	–	-1.36	3-hydroxyacyl-dehydrogenase type-2	A0A088AU44	3388.52	9.66/29.021	9.07/27.099	47.24	oxidoreductase activity
43	–	-1.04	-1.13	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like	A0A088A4Z9	292.27	5.61/26.585	5.04/28.332	25.76	alcohol dehydrogenase (NAD) activity
48	–	-1.15	-1.21	Rab s geranylgeranyltransferase component A1	A0A087ZUJ9	3474.99	4.90/88.937	4.72/57.901	39.33	GDP-dissociation inhibitor activity; oxidoreductase activity
43	–	-1.04	-1.13	Glutathione peroxidase	A0A088AB47	219.72	5.61/26.585	5.64/ 23.133	27.36	glutathione peroxidase activity
43	–	-1.04	-1.13	Thioredoxin domain-containing 9	A0A087ZT30	125.50	5.61/26.585	6.02/25.134	15.81	cell redox homeostasis
42	–	-1.31	-1.49	Farnesol dehydrogenase-like	H9K5X4	26617.52	5.01/26.552	4.92/26.332	48.78	oxidoreductase activity
43	–	-1.04	-1.13			1067.38	5.61/26.585		47.56	

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
46	–	-1.60	-1.63	Prophenoloxidase	Q86MV4	128.91	6.99/78.43	6.28/80.094	10.10	metal ion binding; oxidoreductase activity
Biosynthetic process										
12	-1.00	-1.01	-1.15	Prostaglandin E synthase 3	A0A088ARS8	326.25	4.90/18.909	4.32/20.122	18.75	–
16	-2.46	-1.58	-2.65	Pyridoxamine 5-phosphate oxidase	A0A088ASV9	723.35	8.68/28.711	8.41/30.041	31.23	FMN binding; pyridoxamine-phosphate oxidase activity
27	-1.18	-1.20	-1.45	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic isoform X1	A0A088A2A8	20617.08	6.92/42.758	8.37/45.361	58.27	glutamate-ammonia ligase activity
30	-1.51	-1.32	-2.02			3636.45	6.66/46.632		41.48	
27	-1.18	-1.20	-1.45	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	A0A088AIM3	18685.47	6.92/42.758	5.76/34.560	58.39	glutamate-ammonia ligase activity
30	-1.51	-1.32	-2.02			2737.79	6.66/46.632		39.03	
40	–	-1.38	-1.92	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	A0A088AJ91	292.88	7.54/15.414	6.96/ 16.660	33.1	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase activity; tetrahydrobiopterin biosynthetic process
49	–	-1.07	-2.05	Alanine aminotransferase 1	A0A087ZNZ2	300.66	8.26/59.726	8.53/60.829	21.55	catalytic activity; pyridoxal phosphate binding; biosynthetic process
56	Ø	-1.00	Ø	Hydroxyacylglutathione mitochondrial isoform X1	A0A087ZZF5	1908.96	6.47/33.170	6.83/34.129	38.93	hydroxyacylglutathione hydrolase activity
Amino acid metabolism										
15	-1.68	-1.78	-2.19	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	A0A087ZYZ9	941.70	5.39/26.334	5.17/28.618	42.80	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
17	-1.41	-1.09	-1.71	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	A0A088A605	1699.47	7.80/33.107	6.75/ 31.553	40.00	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase activity
27	-1.18	-1.20	-1.45	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic isoform X1	A0A088A2A8	20617.08	6.92/42.758	8.37/45.361	58.27	glutamate-ammonia ligase activity
30	-1.51	-1.32	-2.02			3636.45	6.66/46.632		41.48	
27	-1.18	-1.20	-1.45	Glutamine synthetase 2 cytoplasmic	A0A088AIM3	18685.47	6.92/42.758	5.76/34.560	58.39	glutamate-ammonia ligase activity
30	-1.51	-1.32	-2.02			2737.79	6.66/46.632		39.03	
49	–	-1.07	-2.05	Alanine aminotransferase 1	A0A087ZNZ2	300.66	8.26/59.726	8.53/60.829	21.55	catalytic activity; pyridoxal phosphate binding; biosynthetic process
Transcription/translation										
07	-1.22	-1.11	-1.53	Ubiquitin-60S ribosomal L40	A0A088AN20	986.55	7.39/11.386	9.87/14.703	21.88	structural constituent of ribosome
25	-1.92	-1.26	-1.95	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	A0A088A549	1180.44	7.42/39.670	6.31/36.627	24.54	translation initiation factor activity
31	-1.03	-1.07	-1.74	Elongation factor 1-gamma	A0A088A224	4843.86	5.56/49.125	6.01/48.986	52.24	translation elongation factor activity
32	-1.33	-1.08	-1.73	Tyrosine--tRNA ligase	A0A088AMC1	5497.27	6.54/57.427	5.73/58.752	62.45	ATP binding; tRNA binding; tyrosine-tRNA ligase activity
51	–	-1.24	Ø	U3 small nucleolar RNA-associated 4 homolog A	A0A088ABI2	178.17	5.74/116.750	9.31/25.315	5.24	rRNA processing
60	–	–	Ø	Eukaryotic initiation factor 4A-I	A0A088AJJ6	11788.26	5.92/56.223	5.29/48.156	62.17	ATP binding; helicase activity; nucleic acid binding

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
Protein folding/binding										
02	Ø	Ø	Ø	Hsp70-binding 1	A0A087ZNK4	537.28	4.63/41.157	4.87/42.752	29.37	–
08	-2.04	-2.10	-2.41	10 kda heat shock mitochondrial	A0A088ARQ3	13544.57	8.83/13.515	8.01/ 11.403	81.73	ATP binding; chaperone
09	-1.33	-1.57	-1.68	Profilin	A0A087ZNT2	9253.49	5.68/13.707	5.64/13.803	40.48	actin binding
				Profilin	Q6QEJ7	9253.49		5.64/13.720	40.48	actin binding
				Profilin	A0A087ZYP1	5384.47		5.73/9.694	21.35	actin binding
32	-1.33	-1.08	-1.73	T-complex 1 subunit eta	A0A087ZUG4	3980.18	6.54/57.427	6.03/59.935	60.15	ATP binding; unfolded protein binding
34	-1.15	-1.14	-1.70	60 kda heat shock mitochondrial-like	A0A088ART2	44137.55	5.60/66.472	5.64/60.413	81.05	ATP binding
Olfactory system										
10	-1,82	-2,16	-2,17	Odorant binding 14	A0A088A4K9	18513.07	5.84/15.597	5.64/ 14.883	80.00	odorant binding
12	-1.00	-1.01	-1.15			118.03	4.90/18.909		11.54	
Learning and memory										
44	–	-1.17	-1.46	14-3-3 epsilon	A0A087ZUP0	47226.49	4.74/29.021	4.78/29.111	51.17	–
44	–	-1.17	-1.46	14-3-3 zeta	A0A088AHG5	9829.84	4.74/29.021	5.41/45.145	47.86	protein domain specific binding
57	Ø	-1.00	Ø			1423.78	6.26/34.299		27.71	
Other/unknown functions										
11	-1.43	-1.63	-2.05	Nucleoside diphosphate kinase	A0A088ATV8	30733.69	7.12/17.376	6.75/17.642	89.61	ATP binding; nucleoside diphosphate kinase activity
12	-1.00	-1.01	-1.15	Calexcitin-2	A0A088AE24	815.55	4.90/18.909	4.79/21.347	19.67	calcium ion binding
13	-1.29	-1.66	-2.19	D2-like isoform X1	A0A088AEV7	5642.22	9.64/23.171	9.18/23.645	31.1	–
13	-1.29	-1.66	-2.19	Proteasome subunit beta type	A0A087ZZ62	356.54	9.64/23.171	7.08/31.653	16.67	Threonine-type endopeptidase activity
14	-1.47	-1.21	-1.61	GTP-binding	A0A087ZWI7	3163.30	7.41/25.657	6.96/24.644	32.09	GTPase activity; GTP binding

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
15	-1.68	-1.78	-2.19	nuclear protein Rho GDP-dissociation inhibitor 2 isoform X1	A0A0B4J2M0	8295.28	5.39/26.334	5.18/23.522	69.27	Rho GDP-dissociation inhibitor activity
18	-1.74	-1.74	-2.00	Phytanoyl-dioxygenase domain-containing 1 homolog	A0A088A5Q3	1953.86	7.12/33.170	6.46/32.676	59.22	—
18	-1.74	-1.74	-2.00	Alpha-tocopherol transfer -like	A0A088AC27	3510.15	7.12/33.170	6.41/32.378	64.52	transporter activity
18	-1.74	-1.74	-2.00	Phosphatidylinositol transfer alpha isoform	A0A088AUP1	17188.21	7.12/33.170	6.20/31.549	88.19	transporter activity
52	Ø	—	Ø			276.62	6.12/28.952		16.24	
18	-1.74	-1.74	-2.00	Electron transfer flavo subunit mitochondrial	A0A088A872	12682.52	7.12/33.170	8.49/35.379	67.57	electron carrier activity; flavin adenine dinucleotide binding
19	-1.16	-1.43	-1.63	26S proteasome non-atpase regulatory subunit 14	A0A087ZR05	5199.85	6.12/34.233	5.87/34.616	60.45	—
19	-1.16	-1.43	-1.63	Glyoxalase domain-containing 4	A0A088AM27	19021.87	6.12/34.233	5.51/32.128	71.89	—
21	-1.80	-1.73	-2.22	Serine/threonine-protein phosphatase	A0A088A299	364.29	5.50/37.782	5.30/ 35.443	37.54	phosphoprotein phosphatase activity
22	-1.55	-1.60	-2.20	Guanine nucleotide-binding subunit beta-2	A0A087ZSH2	1137.35	6.97/37.929	6.15/38.094	38.73	signal transduction

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
24	-2.40	-1.45	-2.50	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	A0A0B4J2M8	549.30	6.77/39.214	6.09/ 37.330	37.31	metal ion binding; N(6)-L-threonylcarbamoyladenine synthase
26	-1.26	-1.85	-2.27	Not identified	—	—	5.84/40.766	—	—	—
31	-1.03	-1.07	-1.74	Phosphotransferase	A0A088A6W8	1994.27	5.56/49.125	5.87/49.643	32.36	ATP binding; glucose binding; hexokinase activity
35	-1.11	—	-1.36	Isochorismatase domain-containing 2-like	A0A088AA38	2661.54	9.66/29.021	8.64/ 22.439	63.05	catalytic activity
36	-1.09	—	-1.56	Enolase isoform X2	A0A088AST9	33993.14	6.95/56.980	6.54/ 39.789	60.93	magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity
37	-1.11	—	Ø	Tubulin beta chain	A0A087ZYZ1	1983.68	4.75/57.746	4.75/50.175	50.56	GTPase activity; GTP binding; structural constituent of cytoskeleton
38	-1.76	—	-2.27	Transferrin	A0A088AFH7	11329.54	7.33/79.621	6.77/78.629	75.14	metal ion binding; iron ion homeostasis
39	-1.15	—	-1.35	Glucosidase 2 subunit beta	A0A088AUN3	136.54	4.24/80.012	4.44/59.829	10.27	calcium ion binding
40	—	-1.38	-1.92	Probable fatty acid-binding isoform X2	A0A088AE74	21838.05	7.54/15.414	8.47/15.223	66.17	lipid binding; transporter activity
40	—	-1.38	-1.92	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kda	A0A088AG51	426.32	7.54/15.414	6.81/ 16.678	23.81	ATP binding
40	—	-1.38	-1.92	Histidine triad nucleotide-binding 1	A0A088AA27	549.33	7.54/15.414	7.05/ 13.973	18.25	catalytic activity
43	—	-1.04	-1.13	Alpha-crystallin A chain isoform X2	A0A088APK0	4497.58	5.61/26.585	5.36/7.684	70.77	—
45	—	-1.19	-1.38	Annexin	A0A088AJH1	87.12	4.45/36.630	4.60/ 35.882	5.57	Calcium-dependent phospholipid binding; calcium ion binding
51	—	-1.24	Ø	Ubiquitin-like	A0A088AVS9	70.58	5.74/116.750	5.41/117.10	5.58	ATP binding; small protein activating enzyme

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
				modifier-activating enzyme 1				6		activity
52	Ø	–	Ø	Hydroxypyruvate isomerase	A0A088A893	2621.24	6.12/28.952	5.93/17.996	57.69	–
54	Ø	–	Ø	Pyridoxal kinase	A0A088AHV4	4901.56	6.36/34.684	6.11/33.348	42.91	pyridoxal kinase activity
59	–	–	-1.31	Electron transfer flavo subunit beta	A0A088A7F1	2484.85	7.59/29.437	6.46/27.581	69.96	electron carrier activity

Tabela Suplementar 2. Identificação dos *spots* 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). A análise de expressão dos *spots* foi realizada utilizando o programa *ImageMaster Platinum*, tendo como referência o proteoma de abelhas não expostas a agrotóxicos (controle) com identificação das proteínas por ESI–MS/MS. Valores positivos (+) indicam potencial aumento de expressão das proteínas. Proteínas que apresentam mais de uma função são apresentadas repetidamente.

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
Stress response										
63	+1.58	+2.27	+2.51	Heat shock 70 kda cognate 5	A0A087ZTY7	72.73	7.58/74.873	6.38/75.404	11.21	ATP binding; unfolded protein binding
70	+1.03	–	+1.18			62.73	7.41/82.328		10.34	
64	+1.19	+1.13	+1.72	Heat shock 70 kda 4 isoform X1	A0A088AGW8	3567.68	6.19/97.918	5.74/ 7.717	54.90	ATP binding
74	–	–	+1.45			404.45	5.98/108.840		7.90	
69	+1.10	–	+1.41	Heat shock 70 kda cognate 3	A0A088ACF4	91.66	5.78/68.396	5.21/72.478	14.2	ATP binding
Carbohydrate metabolism and energy production										
63	+1.58	+2.27	+2.51	Malic enzyme	A0A088AES7	117.73	7.58/74.873	7.55/69.763	15.20	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD ⁺) activity; metal ion binding; NAD binding
67	+1.10	–	+1.70	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit mitochondrial	A0A088AUU5	16078.73	5.64/35.073	5.29/36.322	59.7	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity
72	–	–	+1.36	Pyruvate kinase	A0A088A5I8	863.14	7.68/61.863	6.92/66.565	49.00	kinase activity; magnesium ion binding; potassium ion binding; pyruvate kinase activity
Transcription/translation										
66	+1.05	–	+1.05	Eukaryotic translation initiation factor 3	A0A088ATI4	176.62	5.84/24.009	5.52/24.860	31.02	ribosome binding; translation initiation factor activity

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
subunit K										
Protein folding/binding										
62	+1.04	+1.09	+1.14	Lethal (2) essential for life-like	A0A088A3R7	5098.71	5.65/22.952	5.35/ 22.462	63.21	–
63	+1.58	+2.27	+2.51	Heat shock 70 kda cognate 5	A0A087ZTY7	72.73	7.58/74.873	6.38/75.404	11.21	ATP binding; unfolded protein binding
70	+1.03	–	+1.18			62.73	7.41/82.328		10.34	
64	+1.19	+1.13	+1.72	Heat shock 70 kda 4 isoform X1	A0A088AGW8	3567.68	6.19/97.918	5.74/ 7.717	54.90	ATP binding
74	–	–	+1.45			404.45	5.98/108.840		7.90	
66	+1.05	–	+1.05	Lethal (2) essential for life-like	A0A088A3R9	200.63	5.84/24.009	5.40/ 23.002	22.96	–
69	+1.10	–	+1.41	Heat shock 70 kda cognate 3	A0A088ACF4	91.66	5.78/68.396	5.21/72.478	14.2	ATP binding
Other/unknown functions										
01	+1.22	+1.37	+1.52	Not identified	–	–	4.51/9.663	–	–	–
61	+2.53	+2.18	+3.17	Not identified	–	–	4.55/10.341	–	–	–
62	+1.04	+1.09	+1.14	Lactoylglutathione lyase	A0A088ALN9	536.31	5.65/22.952	5.45/ 21.100	20.22	lactoylglutathione lyase activity; metal ion binding
65	–	+1.14	+2.14	Translationally-controlled tumor homolog	A0A087ZVC8	3042.71	4.53/21.327	4.57/ 19.843	46.51	–
67	+1.10	–	+1.70	F-actin-capping subunit alpha	A0A088A627	3391.82	5.64/35.073	5.15/34.139	57.33	phosphatase activity
68	+1.01	–	+1.30	26S proteasome non-atpase regulatory subunit 13	A0A088AD16	2878.38	6.54/42.904	6.29/42.315	42.09	–
69	+1.10	–	+1.41	Protein disulfide-isomerase	A0A088A7Y2	8979.38	5.78/68.396	5.57/55.857	58.78	protein disulfide isomerase activity

Spot ID	Fold Change in P	Fold Change in F	Fold Change in PF	Protein	Access	Score	pI/MM experimental	pI/MM theoretical	Coverage (%)	Molecular function
69	+1.10	–	+1.41	Calpain-A isoform X3	A0A087ZX44	164.52	5.78/68.396	4.80/88.160	15.57	calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity; calcium ion binding
71	–	–	+1.13	Not identified	–	–	4.07/25.840	–	–	–
72	–	–	+1.36	Serine--trna cytoplasmic	A0A088A397	3042.41	7.68/61.863	6.82/57.414	38.91	ATP binding; serine-tRNA ligase activity
73	–	–	+1.05	Carboxylic ester hydrolase	A0A087ZXF6	32765.91	5.90/71.385	5.56/59.668	63.38	hydrolase activity
73	–	–	+1.05	Dihydropyrimidinase isoform X2	A0A088ALH3	349.01	5.90/71.385	5.84/ 74.941	25.58	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds

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.