

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

METABOLISMO OXIDATIVO EM ABELHAS NUTRIZES
(*Apis mellifera*) ALIMENTADAS COM PÓLEN DE GIRASSOL
ORIUNDO DE PLANTAS TRATADAS COM
FUNGICIDA DE TRÍPLICE AÇÃO

Thaís Regina Ramos Alves
Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

METABOLISMO OXIDATIVO EM ABELHAS NUTRIZES
(Apis mellifera) **ALIMENTADAS COM PÓLEN DE GIRASSOL**
ORIUNDO DE PLANTAS TRATADAS COM
FUNGICIDA DE TRÍPLICE AÇÃO

Thaís Regina Ramos Alves
Orientador Prof. Dr. Daniel Nicodemo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Nutrição Animal.

2023

A474m	Alves, Thaís Regina Ramos Metabolismo oxidativo em abelhas nutrizes (<i>Apis mellifera</i>) alimentadas com pólen de girassol oriundo de plantas tratadas com fungicida de tríplice ação / Thaís Regina Ramos Alves. -- Jaboticabal, 2023 66 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Daniel Nicodemo 1. <i>Apis mellifera</i>. 2. nutrição. 3. restrição alimentar. 4. fungicidas. 5. estresse oxidativo. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: METABOLISMO OXIDATIVO EM ABELHAS NUTRIZES (*Apis mellifera*)
ALIMENTADAS COM PÓLEN DE GIRASSOL ORIUNDO DE PLANTAS
TRATADAS COM FUNGICIDA DE TRIPLICE AÇÃO

AUTORA: THAÍS REGINA RAMOS ALVES

ORIENTADOR: DANIEL NICODEMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área:
Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
DANIEL NICODEMO
Data: 16/10/2023 08:31:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DANIEL NICODEMO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT Unesp Dracena

 Documento assinado digitalmente
FABIO ERMINIO MINGATTO
Data: 11/10/2023 16:36:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Titular FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT UNESP Dracena

 Documento assinado digitalmente
DAVID DE JONG
Data: 16/10/2023 09:44:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DAVID DE JONG (Participação Virtual)
Departamento de Genética / FMRP USP Ribeirão Preto

Jaboticabal, 06 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

THAÍS REGINA RAMOS ALVES – Nascida em 16 de maio de 1995, em Jaborandi – São Paulo. Graduada em Engenharia Agrônômica pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) – UNESP, Câmpus de Dracena, em 2021 e integrante do grupo de estudos NOS – Núcleo de Operações Sustentáveis. No mesmo ano, ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, na área de Nutrição Animal, orientada pelo Prof. Dr. Daniel Nicodemo.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. A sociedade das abelhas melíferas	2
1.3. Nutrição das abelhas	6
1.4. Principais efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas	11
1.4.1. O fungicida bixafem	14
1.4.2. O fungicida trifloxistrobina.....	15
1.4.3. O fungicida protioconazol	15
1.5. Sistema antioxidante celular e estresse oxidativo em abelhas.....	17
2. Objetivos	20
Referências	21
2. CAPÍTULO 2 – Restrição alimentar e contaminação do pólen com fungicida de ação múltipla promovem estresse oxidativo e redução da longevidade em abelhas melíferas	36
2. CHAPTER 2 – Feed restriction and pollen contamination with multi action fungicide promote oxidative stress and reduced longevity in honey bees	37
2.1. Introdução	38
2.2. Material e métodos.....	40
2.2.1. Local do experimento	40
2.2.2. Cultivo de girassol, tratamento com fungicida e obtenção de pólen.....	40
2.2.3. Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas.....	42
2.2.4. Coleta de pólen e eficiência dos coletores de pólen.....	43
2.2.5. Obtenção de abelhas recém emergidas e preparação das dietas experimentais	43
2.2.6. Obtenção e dosagem de proteínas no homogenato do tórax	44
2.3. Análise do estresse oxidativo em abelhas melíferas nutrízes	45

2.3.1. Atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de tórax.....	45
2.3.1.1. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)	45
2.3.1.2. Atividade da enzima catalase (CAT)	45
2.4. Concentração de oxidantes não enzimáticos.....	46
2.4.1. Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH)	46
2.4.2. Determinação da concentração de glutathione oxidada (GSSG)	46
2.4.3. Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	46
2.4.4. Avaliação da lipoperoxidação	47
2.4.5. Avaliação do peso inicial e da longevidade das abelhas	47
2.5. Análises estatísticas	48
2.6. Resultados	48
2.6.1. Manejo alimentar e coleta de pólen	48
2.6.2. Eficiência dos coletores de pólen.....	49
2.6.3. Consumo de alimento proteico e metabolismo oxidativo	49
2.6.4. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx).....	50
2.6.5. Atividade da enzima catalase (CAT)	50
2.6.6. Concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	50
2.6.7. Estado oxidativo nos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	51
2.6.8. Avaliação da lipoperoxidação	51
2.6.9. Peso inicial e longevidade das abelhas	53
3. Discussão.....	54
4. Conclusão	60
Referências	60

METABOLISMO OXIDATIVO EM ABELHAS NUTRIZES (*Apis mellifera*) ALIMENTADAS COM PÓLEN DE GIRASSOL ORIUNDO DE PLANTAS TRATADAS COM FUNGICIDA DE TRIPLICE AÇÃO

RESUMO

Uma nova estratégia para combater fungos fitopatogênicos baseia-se no uso de fungicidas com dois ou mais ingredientes ativos, visando controlar a população de fungos em diferentes estágios de vida simultaneamente. Embora essa alternativa tenha se mostrado promissora do ponto de vista agrônomo, para os apicultores, tal medida parece ser preocupante. Nesse contexto, o estado nutricional das colônias deve ser considerado, uma vez que deficiências nutricionais podem levar a uma maior suscetibilidade a estressores, como fungicidas. O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos do manejo alimentar de colônias de abelhas melíferas e de um fungicida comercial à base de bixafem, protioconazol e trifloxistrobina no sistema antioxidante celular de abelhas nutrízes e na longevidade das operárias. Durante 24 semanas, oito colmeias do mesmo apiário foram divididas em dois grupos experimentais. No primeiro grupo, quatro colônias tiveram sua alimentação natural suplementada semanalmente com pasta proteica à base de pólen apícola e mel (4:1) e xarope energético com água e açúcar (1:1). As quatro colônias do outro grupo não tiveram sua alimentação suplementada e, para restringir a entrada de pólen, um coletor de pólen foi instalado na entrada de cada colmeia. Após o período de manejo alimentar das colônias, abelhas recém emergidas foram colocadas em gaiolas plásticas, onde sendo alimentadas por cinco dias com dieta à base de pólen de girassol oriundo de plantas tratadas ou não com o fungicida Fox Xpro e mel (3:1). Após o período de alimentação, o status oxidativo foi observado utilizando-se *pool/s* musculares dos tórax das abelhas. A atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) foi maior em abelhas de colônias que receberam suplementação alimentar, enquanto as atividades da catalase (CAT) e da glutathione reduzida (GSH) foram maiores em abelhas de colônias com alimentação restrita. A concentração dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) no homogeneizado do tórax foi maior em abelhas de colônias que receberam suplementação alimentar. As atividades da CAT e GPx foram maiores quando as abelhas receberam pólen não tratado com fungicida. A alimentação contendo pólen de girassol tratado com fungicida aumentou os níveis de malondialdeído (MDA), indicando prejuízos à membrana celular. A restrição alimentar das colônias e a alimentação das abelhas adultas contendo pólen oriundo de plantas tratadas com fungicida implicou em diminuição da longevidade das abelhas.

Palavras-chave: bixafem, nutrição, protioconazol, saúde das abelhas, toxicidade, trifloxistrobina.

**OXIDATIVE METABOLISM IN NURSING BEES (*Apis mellifera*) FED
WITH SUNFLOWER POLLEN FROM PLANTS TREATED WITH
TRIPLE-ACTION FUNGICIDE**

ABSTRACT

A new strategy to combat phytopathogenic fungi is based on the use of fungicides with two or more active ingredients, aiming to control the fungal population at different life stages simultaneously. Although this alternative has shown promise from an agronomic perspective, it seems worrisome to beekeepers. In this context, the nutritional status of colonies must be considered, as nutritional deficiencies can lead to increased susceptibility to stressors such as fungicides. The objective of this study was to investigate the effects of the feeding management of honeybee colonies and a commercial fungicide based on bixafen, prothioconazole, and trifloxystrobin on the cellular antioxidant system of nurse bees and the longevity of worker bees. For 24 weeks, eight hives from the same apiary were divided into two experimental groups. In the first group, four colonies had their natural feeding supplemented weekly with protein paste made from bee pollen and honey (4:1) and an energy syrup made from water and sugar (1:1). The four colonies in the other group did not receive supplemental feeding, and to restrict pollen entry, a pollen collector was installed at the entrance of each hive. After the feeding management period of the colonies, newly emerged bees were placed in plastic cages and fed for five days with a diet based on sunflower pollen from plants treated or untreated with the fungicide Fox Xpro and honey (3:1). After the feeding period, the oxidative status was assessed using muscle pools from the thorax of the bees. The enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) was higher in bees from colonies that received dietary supplementation, while the activities of catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) were higher in bees from colonies with restricted feeding. The concentration of pyridine nucleotides (NAD(P)H) in the thorax homogenate was higher in bees from colonies that received dietary supplementation. CAT and GPx activities were higher when bees received pollen untreated with fungicide. Feeding with fungicide-treated sunflower pollen increased the levels of malondialdehyde (MDA), indicating damage to the cell membrane. Dietary restriction of colonies and feeding adult bees with pollen from fungicide-treated plants resulted in decreased bee longevity.

Keywords: bee health, bixafen, toxic effects, nutrition, prothioconazole, trifloxystrobin.

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1. Introdução

As abelhas são os polinizadores mais importantes do planeta Terra. Há indícios de que esses insetos surgiram no Cretáceo médio, há cerca de 140 a 110 milhões de anos, período que coincide com a origem e a diversificação inicial das plantas angiospermas (Danforth et al., 2013). Atualmente, existem cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas (Ascher e Pickering, 2012), que desempenham um papel fundamental na polinização de mais de 250.000 espécies de angiospermas (Soltis et al., 2005).

A coevolução entre as angiospermas e seus respectivos insetos polinizadores é considerada um dos exemplos mais notáveis de mutualismo, sendo uma relação entre espécies diferentes e que beneficia todos os envolvidos na interação. As abelhas são atraídas pelas cores e pelos aromas das flores e, ao coletarem o néctar e o pólen, acabam transferindo os gametas masculinos de uma flor para outra, possibilitando a fecundação e consequentemente a produção de frutos e sementes (Cappellari et al., 2013).

A relação do homem com as abelhas teve início no período paleolítico, cerca de 6.000 anos a.C, conforme evidenciado por pinturas rupestres em cavernas na África e Europa. No entanto, a prática era rudimentar e prejudicava a sobrevivência das colônias (Crane, 1999). A apicultura migratória foi desenvolvida no Egito antigo e em regiões mediterrâneas, há cerca de 4.400 anos, com registros de criação de abelhas em potes de argila (Crane, 1999). A partir do desenvolvimento de técnicas para a criação de abelhas, a apicultura evoluiu de forma racional, com destaque para a criação da colmeia padrão Langstroth, em 1851 (Crane, 1999; Couto e Couto, 2006). Além de serem importantes agentes polinizadores de culturas agrícolas e florestais, é possível obter vários produtos utilizados pelos humanos, como mel, própolis, pólen, cera, geleia real, apitoxina, crias e abelhas adultas das colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Couto e Couto, 2006).

As abelhas melíferas possuem características comportamentais e adaptações morfológicas que as tornam muito eficientes para os serviços de polinização, como constância floral, presença de pelos em todo o corpo e estruturas de coleta e transporte de recursos florais (corbículas) (Crane, 1999). A produção

de alimentos é altamente dependente da polinização realizada por insetos e as abelhas desempenham um papel fundamental no funcionamento do ecossistema, promovendo a fecundação vegetal, manutenção da variabilidade genética e preservação da biodiversidade das plantas. Estima-se que 75% das principais espécies de culturas cultivadas globalmente dependem de polinizadores para obtenção de safras de boa qualidade e/ou quantidade, sendo que aproximadamente um terço da dieta humana, a partir de vegetais e frutas é influenciado pelos serviços de polinização por abelhas (Klein et al., 2007; Potts et al., 2010; Rondeau e Raine, 2022).

No entanto, à medida que a dependência global dos polinizadores aumenta, muitas práticas agrícolas modernas ameaçam as abelhas e seus serviços de polinização (Aizen et al., 2019). Nos últimos anos, o declínio das populações de abelhas tem sido relatado em várias regiões do mundo (Brodschneider et al., 2018; Gray et al., 2019; Sánchez-Bayo e Wyckhuysb, 2019). Estresse nutricional, aumento do uso de agrotóxicos, perda e fragmentação de habitats, pragas, infecção por patógenos, mudanças climáticas e seleção genética estão entre as principais causas das perdas de colônias (Carreck e Neumann, 2010; Steinhauer et al., 2018; Soroye et al., 2020).

Pesquisas apontam que o estresse nutricional e o uso excessivo de agrotóxicos são os fatores responsáveis por esse fenômeno. O estresse nutricional ocorre devido ao desmatamento e às monoculturas agrícolas intensivas, que limitam a disponibilidade de recursos alimentares. Além disso, o uso indiscriminado de agrotóxicos contribui para a contaminação dos alimentos e dos habitats das abelhas, comprometendo sua saúde e sobrevivência (Potts et al., 2016; DeGrandi-Hoffman et al., 2018; Sgolastra et al., 2020; Linguadoca et al., 2021).

1.2. A sociedade das abelhas melíferas

As abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.; Hymenoptera, Apidae) são insetos eusociais, também conhecidos como "verdadeiramente sociais". Essa caracterização se deve à manifestação de uma cooperação intrínseca na reprodução e à evidente divisão de tarefas em seu sistema social (Gullan e Cranston, 2017). Elas são consideradas espécies cosmopolitas devido à sua ampla distribuição geográfica. Resultado de séculos de domesticação e transporte

intencional pelo ser humano, as abelhas melíferas agora habitam todos os continentes, à exceção da Antártida e em muitas ilhas oceânicas (Gupta, 2014; Hung et al., 2018).

As abelhas são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, na qual os padrões de desenvolvimento corporais são distintos, sendo ovo, larva, pupa e adulto. A fase de ovo é iniciada com a postura da rainha em células de cera hexagonais, construídas pelas operárias. As larvas eclodem dos ovos e são alimentadas com mel, pólen, geleia de operária ou com geleia real (Haydak, 1943; Wang et al., 2016). Durante a fase larval, as abelhas se alimentam, ganham peso e crescem enquanto os alvéolos estão abertos. A fase larval termina com o início da metamorfose, quando os alvéolos são operculados pelas abelhas adultas. Nesse momento, a larva tece seu casulo e se transforma em pupa. Durante a fase pupal, ocorre a transformação da pupa para o adulto. A duração da fase de pupa varia de acordo com a casta da abelha, sendo que as rainhas têm um período de desenvolvimento mais curto do que as operárias e os zangões (Gupta, 2014). Ao final da metamorfose, o adulto recém-formado rói o opérculo e sai do alvéolo. Como holometábolos, as abelhas já nascem em um estágio de desenvolvimento completo, mas passam por alterações metabólicas que culminam em realizar diferentes funções que são desempenhadas ao longo de suas vidas.

No caso da rainha, uma das principais alterações está relacionada à maturidade sexual. A rainha é a única abelha fértil da colmeia e sua principal função é a reprodução. Ela possui órgãos reprodutivos bem desenvolvidos, como os ovários, que lhe permitem produzir e armazenar um grande número de ovos. Essas adaptações permitem que a rainha cumpra seu papel fundamental na colmeia, favorecendo a perpetuação da população de abelhas (Gupta, 2014; Winston, 2003).

A sociedade das abelhas é caracterizada por uma hierarquia bem definida e por diferentes castas de indivíduos, sendo composta por uma única rainha, operárias que podem estar presentes em quantidade que varia de milhares a dezenas de indivíduos e zangões que podem estar ausentes ou atingirem contingente de aproximadamente mil indivíduos, com cada casta responsável por executar funções específicas (Page e Peng, 2001). O desenvolvimento de fêmeas, seja rainhas ou operárias, advém de óvulos fertilizados, enquanto os ovos não

fertilizados resultam em machos. Apesar do genótipo compartilhado entre rainhas e operárias, elas apresentam diferenças consideráveis em comportamento, fisiologia e desenvolvimento (Winston, 1991).

Os zangões são os machos da colônia e são produzidos apenas em épocas com abundância de alimentos para as abelhas. Sua única função é a reprodução, sendo responsável pela fecundação da rainha (Winston, 1991; Rueppell et al., 2016). A rainha é a única fêmea fértil da colmeia e é responsável pela postura de ovos, podendo ovipositar até 2.000 ovos por dia e, devido essa função reprodutiva que requer nutrição de ótima qualidade, é alimentada exclusivamente com geleia real durante toda sua vida, o que lhe confere maior longevidade e alta capacidade reprodutiva (Winston, 1991; Rueppell et al., 2016).

Os demais membros da colmeia são as operárias, fêmeas que cumprem todas as funções não reprodutivas, desde a limpeza da colmeia e cuidado com a cria até defesa e processo de forrageamento (Winston, 1991). As operárias possuem padrões de divisão de trabalho, comportamento típico baseado na idade, reconhecido como polietismo temporal (Huang e Robinson, 1996). As operárias jovens, conhecidas como nutrizes, durante as primeiras três semanas de vida adulta, realizam tarefas dentro do ninho, como limpeza e alimentação das crias (Winston, 1991). As operárias de meia-idade realizam a construção de favos, recepção de néctare guardam a entrada da colmeia (defesa), já as operárias mais velhas realizam tarefas externas, como forrageamento, em busca de alimento, água e matérias primas da própolis, podendo voar mais de 10 quilômetros por dia (Winston, 1991; Robinson, 1992; Beshers e Fewell, 2001; Page e Peng, 2001).

De acordo com Michener (1974), os mecanismos envolvidos na diferenciação das castas apresentam certa generalidade, com diferenças sutis entre as diversas espécies de abelhas. Em abelhas melíferas, o mecanismo básico de determinação das castas é regulado pela quantidade e qualidade do alimento fornecido às larvas (Townsend e Shuel, 1962; Jay, 1963; Rembold, 1964; Weaver, 1974; Beetsma, 1979). Segundo Peng e Jay (1977), todas as larvas fêmeas com menos de três dias de idade têm a capacidade de se desenvolver como operárias ou rainhas, dependendo da alimentação fornecida pelas abelhas nutrizes. Essa diferenciação entre rainha e operária é influenciada pelos níveis de hormônio juvenil

durante o período crítico do desenvolvimento larval (Wilde e Beetsma, 1982). A produção desse hormônio está diretamente relacionada à quantidade e à composição do alimento fornecido às larvas (Asencot e Lensky, 1977).

Os feromônios também desempenham um papel crucial na organização social e na comunicação das abelhas *A. mellifera*. São substâncias químicas produzidas por indivíduos para transmitir informações a outros membros da mesma espécie. Em abelhas, feromônios são produzidos em diversas glândulas e desempenham funções diversas, como atração sexual, alarme, orientação, regulação da casta e da divisão do trabalho (Free, 1987; Slessor et al., 2005). Por exemplo, a rainha produz um complexo de feromônios, conhecido como feromônio da rainha, que regula o comportamento e a fisiologia das operárias e zangões (Winston e Slessor, 1992; Slessor et al., 2005). Esse feromônio da rainha suprime o desenvolvimento ovariano nas operárias, atraindo os zangões durante o voo nupcial e sinalizando sua presença para a colônia (Butler e Fairey, 1964; Slessor et al., 2005).

As abelhas operárias com idade entre cinco e 12 dias, conhecidas como nutrízes, possuem glândulas mandibulares e hipofaríngeas que nessa fase do desenvolvimento são fundamentais para a produção de alimento larval. A geleia é um produto das secreções das glândulas hipofaríngeas (de consistência aquosa) e mandibulares (de consistência leitosa) (Haydak, 1970), localizadas na cabeça das abelhas operárias. Essas glândulas produzem enzimas que metabolizam os nutrientes liberados por meio da digestão do pólen (Winston, 2003; Deseyn e Billen, 2005). Essa substância é essencial para a alimentação das larvas e da rainha, contribuindo para o crescimento, desenvolvimento, imunidade e longevidade das abelhas (Crailsheim et al., 1992; Crailsheim, 1998; Zaluski et al., 2017; Vaudo et al., 2015).

A geleia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das abelhas, pois sua composição influencia a diferenciação das castas. Contudo, a composição diferenciada do alimento entre rainhas e operárias não é baseada apenas na quantidade de açúcares, como a hexose. Embora a quantidade de 35% de hexose geralmente seja relacionada ao desenvolvimento de uma rainha e uma quantidade de 10% esteja associada ao desenvolvimento de uma operária, essa

não é a única diferença importante para a diferenciação de operárias e rainhas (Kamakura, 2011). A geleia que alimenta as larvas destinadas a se tornarem rainhas contém níveis mais altos de proteínas e lipídios, além de ser enriquecida com ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA), uma substância bioativa com propriedades antibacterianas, que contribui para o desenvolvimento da larva para se tornar uma rainha. Além disso, as larvas que se tornarão rainhas são alimentadas exclusivamente com geleia real ao longo de todo o seu desenvolvimento larval, enquanto as larvas de operárias passam a receber uma dieta de pólen e mel, conhecida como "pão de abelha", após os três primeiros dias (Kamakura, 2011).

As larvas de rainhas são alimentadas de maneira mais intensiva do que as de operárias, pois as operárias nutrizas visitam as larvas que resultarão em rainhas cerca de dez vezes mais do que as larvas de operárias. Assim, as larvas que se tornarão rainhas ingerem maiores quantidades de alimento, com maior frequência e por um período de tempo maior, além de ter melhor qualidade. Portanto, a diferenciação de castas em abelhas melíferas é um processo complexo e multifatorial que envolve não apenas a quantidade, mas também a qualidade do alimento fornecido às larvas (Haydak, 1970; Winston, 1991; Kamakura, 2011).

1.3. Nutrição das abelhas

As colônias de abelhas melíferas são consideradas um superorganismo, o que implica que a nutrição desses insetos deve ser abordada em três níveis distintos: nutrição da colônia, nutrição larval e nutrição dos adultos. Esses níveis estão interligados e qualquer perturbação em um estágio pode afetar as fases subsequentes. Portanto, é crucial estudar a nutrição das abelhas em cada um desses níveis, levando em consideração a complexidade crescente ao longo do desenvolvimento (Seeley, 1989).

As abelhas dependem do néctar e do pólen das plantas como fontes de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento. O néctar, uma solução açucarada produzida nos nectários florais, é a principal fonte de carboidratos e minerais, enquanto o pólen retirado das anteras das flores é a principal fonte de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. No entanto, é importante ressaltar que o conteúdo nutricional do néctar e do pólen variam dependendo da espécie botânica de onde são coletados. Esses nutrientes são cruciais para o crescimento e

desenvolvimento das larvas, bem como para a manutenção da capacidade reprodutiva e produtiva das abelhas adultas. Portanto, a disponibilidade e qualidade do néctar e do pólen são fatores determinantes para a saúde, sobrevivência e longevidade das colônias de abelhas (Herbert e Shimanuki, 1978; Zucoloto, 1994; Baker e Baker, 1983; Roulston e Cane, 2000; Brodschneider e Crailsheim, 2010; Couto, 1998; DeGrandi-Hoffman et al., 2018).

As abelhas adultas de todas as idades se alimentam de néctar, mas o consumo de pólen é mais comum entre as operárias jovens, também conhecidas como abelhas nutrizas. É importante ressaltar que o fornecimento adequado de alimento energético, como o néctar, estimula a produção de cria. No entanto, é o estoque de pólen que desempenha um papel crucial no desenvolvimento completo das larvas e dos adultos. Baixos estoques de pólen na colmeia podem comprometer o crescimento e desenvolvimento adequado das abelhas em todas as fases de vida (Cremonez, 2001). Diferentemente das larvas, as abelhas adultas mantêm estoques reduzidos de glicogênio, variando entre 0,05 a 0,47 mg por operária. Quando necessitam de energia, como antes dos voos de forrageamento, as abelhas operárias campearas recorrem aos açúcares. Esses açúcares podem ser obtidos das reservas de mel armazenadas nos favos ou através de trofalaxia, um processo de troca de alimento com outra abelha operária (Hrassnigg e Crailsheim, 2005; Wright et al., 2018). Isso ressalta a importância dos carboidratos, especialmente do mel, na dieta das abelhas adultas para suprir suas necessidades energéticas. De acordo com Zucoloto (1994), os carboidratos presentes na dieta dos insetos, incluindo as abelhas, atuam como fagoestimulantes, estimulando a ingestão de alimentos. Portanto, é esperado que as abelhas consumam uma maior quantidade de alimento quando a dieta é rica em carboidratos. Os carboidratos utilizados pelas abelhas incluem glicose, frutose, maltose, sacarose, trealose e melezitose. No entanto, outras fontes de carboidratos, como xilose, galactose, lactose, melibiose, manose, rafinose e arabinose são consideradas tóxicas para as abelhas (Barker e Lehner, 1974; Barker, 1977).

O pólen desempenha um papel crucial no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, mandibulares e tecido adiposo das abelhas (Herbert e Shimanuki, 1978; Pinto et al., 2014). Entretanto, as abelhas não armazenam grandes

quantidades de pólen por grandes períodos na colmeia como fazem com o mel, o que significa que os estoques de pólen diminuem rapidamente em períodos de escassez de flores na natureza (Schmickl e Crailsheim, 2002). A disponibilidade de proteína é um fator limitante para o crescimento e manutenção das colônias, e a falta de consumo adequado de proteína pode levar a uma redução na longevidade, na quantidade de cria e na produção de mel (Herbert e Shimanuki, 1978; Winston et al., 1983; Mattila e Otis, 2006).

Colônias com acesso limitado ao pólen têm dificuldade em cuidar da cria, o que pode levar a um declínio populacional rápido e, eventualmente, à morte da colônia (Mattila e Otis, 2006). Durante o processo de fermentação do pólen, as abelhas misturam o pólen coletado com néctar regurgitado, secreções e bactérias presentes no estômago, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, podem melhorar o valor nutritivo do pólen por meio da produção de vitaminas (Vásquez e Olofsson, 2009). O resultado dessa fermentação é conhecido como pão de abelha ou *beebread*, que possui um pH mais baixo e de menor concentração de amido em comparação com o pólen apícola (Ellis e Hayes, 2009).

Todos os animais, incluindo as abelhas, necessitam de aminoácidos essenciais para um bom desenvolvimento. As abelhas obtêm esses aminoácidos essenciais por meio do consumo de pólen. No entanto, nem todos os pólenes são nutricionalmente iguais. As abelhas geralmente coletam vários tipos de pólen, pois a qualidade proteica do pólen pode variar significativamente, com teores de 2,5% a 61% proteína bruta (PB) (Roulston e Cane, 2000; Roulston et al., 2000). Alguns pólenes podem apresentar deficiências quanto aos dez aminoácidos essenciais para as abelhas. Esses incluem: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano (De Groot, 1953; Cremonez, 1998). As colônias atingem seu desenvolvimento ótimo quando recebem entre 20 a 23% de proteína bruta. No entanto, para o crescimento adequado das abelhas, não basta apenas fornecer proteínas: a composição correta de aminoácidos é crucial. Em uma base de 20% de proteína digestível, as abelhas necessitam dos seguintes aminoácidos essenciais: 3% de arginina, 2,5% de fenilalanina, 1,5% de histidina, 4% de isoleucina, 4,5% de leucina, 3% de lisina, 1,5% de metionina, 3% de treonina, 1% de triptofano e 4% de valina (De Groot, 1953; Herbert Jr. et al., 1977).

No que diz respeito aos lipídios, as abelhas os obtêm exclusivamente do pólen. Vale destacar que o conteúdo lipídico pode variar significativamente entre pólenes de diferentes espécies, variando de 0,8% a 18,9% (Roulston e Cane, 2000).

A falta de um ou mais dos dez aminoácidos essenciais na dieta das abelhas pode enfraquecer a colônia. A grande variação na composição química do pólen tem diferentes efeitos na fisiologia das abelhas (Cremonez, 2001). Vinte horas após a emergência, mais de 50% das abelhas operárias começam a consumir pequenas quantidades de pólen (Dietz, 1969). O consumo máximo de pólen ocorre quando as abelhas têm entre 42 e 52 horas de idade (Hagedorn e Moeller, 1967). Durante a primeira semana de vida adulta, ocorre o maior consumo de pólen pelas operárias. Após cinco dias de emergência, observa-se um aumento significativo no conteúdo de nitrogênio das abelhas. Especificamente, o conteúdo de nitrogênio aumenta cerca de 93% na cabeça, 76% no abdômen e 37% no tórax. Essas mudanças no consumo de pólen e no conteúdo de nitrogênio refletem a importância do pólen na nutrição e no desenvolvimento das abelhas ao longo de sua vida adulta (Haydak, 1949; Di Pasquale, 2013).

Entre o quinto e décimo quinto dia de vida, ocorre uma síntese significativa de proteínas no corpo gorduroso das abelhas, principalmente de vitelogenina, com isso, durante os primeiros seis dias de vida adulta, as abelhas nutrízes consomem grandes quantidades de pólen para obterem as proteínas, aminoácidos, vitaminas e sais minerais suficientes para as abelhas realizarem as diferentes funções e atingirem sua expectativa de vida (Engels et al., 1990). À medida que as abelhas envelhecem, o requerimento de pólen diminui e o requerimento de carboidratos aumenta, uma vez que elas precisam de energia para realizarem atividades como o voo (Crailsheim, 1990).

Quando as abelhas nutrízes começam a produzir geleia para alimentar as larvas jovens e a rainha, elas requerem uma dieta rica em proteínas e vitaminas, incluindo as do complexo B, tiamina, ácido pantotênico, riboflavina, nicotinamida, ácido fólico, biotina e o ácido ascórbico (vitamina C) sendo essenciais para o crescimento das larvas (Crailsheim, 1990), que crescem exponencialmente durante seus primeiros 5 dias de vida (Huang, 2010).

A geleia, que é consumida pelas larvas das abelhas, é composta por (60-

70%) de água, (9-18%) de proteínas, (7-18%) de açúcares simples (monossacarídeos) e (3-8%) lipídios. Além disso, a composição da geleia abarca elementos menores, mas igualmente significativos, incluindo uma variedade de minerais como ferro (Fe), sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), zinco (Zn), magnésio (Mg), manganês (Mn), cloro (Cl), fósforo (P), cobre (Cu), iodo (I), cobalto (Co), zinco (Zn) e níquel (Ni). A geleia também é rica em aminoácidos essenciais, incluindo valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, fenilalanina, lisina e triptofano, vitaminas (A, complexo B, C e), enzimas, hormônios, polifenóis, nucleotídeos e menores compostos heterocíclicos (Sabatini et al., 2009). Esses minerais são importantes em várias funções fisiológicas, essenciais para o desenvolvimento e saúde das abelhas (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

A alimentação deficitária das colônias pode ter consequências negativas, incluindo declínio populacional e desarranjo da estrutura etária, o que pode afetar a longevidade das abelhas (Schulz et al., 1998). Além disso, a má nutrição pode tornar as abelhas mais suscetíveis às doenças e parasitas, e a presença desses estressores pode agravar a situação de escassez alimentar da colmeia, levando a uma ineficiente realização do trabalho realizado pelas abelhas (Naug e Gibbs, 2009). Esses fatores combinados podem levar ao declínio e até mesmo à morte da colônia (Mayack e Naug, 2009). O fornecimento de suplementos artificiais a partir de fontes alternativas de proteína é uma alternativa viável para garantir o desenvolvimento e a multiplicação das colônias em curtos períodos de tempo, uma vez que esses alimentos não são substitutos do alimento natural das abelhas (Herbert, 1992; Somerville, 2005).

Em casos de mortalidade de colônias de abelhas, é comum questionar os cuidados com esses insetos, especialmente em relação ao estado nutricional. Esse questionamento é válido, uma vez que o suporte nutricional adequado é fundamental para a manutenção da saúde das abelhas (Brodschneider e Crailsheim, 2010; Klein et al., 2017). Mesmo quando há alimento disponível no campo, as abelhas podem não estar bem nutridas. A expansão de monoculturas tem contribuído para o desequilíbrio nutricional das abelhas, uma vez que uma única fonte de pólen dificilmente contém todos os aminoácidos essenciais, o que é desfavorável para o sistema imunológico, especialmente quando a dieta disponível

tem baixo teor proteico. Nesse caso, manter uma dieta com alto valor nutricional para as abelhas, mesmo com suplementação artificial, pode ajudar a torná-las mais resilientes aos desafios que enfrentam na natureza (Alaux et al., 2010; Dolezal e Toth, 2018).

Para as abelhas, parece haver uma interação entre estágio nutricional das colônias e o efeito dos agrotóxicos, havendo maior impacto na saúde das abelhas acometidas pelos agrotóxicos quando estão desnutridas (Rortais et al., 2005; Johnson et al., 2010; Tosi et al., 2017). Pesquisas recentes destacam como a exposição aos agrotóxicos, combinada com uma dieta deficitária, pode levar a alterações no comportamento, na reprodução e na imunidade das abelhas, e a combinação desses fatores estressantes parece ter um efeito sinérgico, amplificando os danos potenciais às abelhas e, consequentemente, à capacidade da colônia de sobreviver e prosperar (Mao et al., 2017; Tong et al., 2019; Hernández et al., 2021).

1.4. Principais efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas

Plantas cultivadas são suscetíveis ao ataque de pragas e doenças desde os primórdios da agricultura. No entanto, o aumento da população humana ao longo dos séculos XX e XXI implicou na necessidade de expandir as áreas de cultivo de plantas e animais. Isso levou à adoção de agrotóxicos sintéticos como uma medida para garantir safras suficientes para suprir a demanda por alimentos (Oerke, 2006). Segundo Lima e Rocha (2012), as práticas agrícolas têm afetado significativamente os polinizadores especialmente devido ao uso inadequado de agrotóxicos.

Os impactos negativos sobre os polinizadores podem ser divididos em impactos letais ou subletais. O efeito letal ocorre quando os polinizadores morrem devido à exposição a agrotóxicos, principalmente quando as flores que visitam estão contaminadas. Esse efeito letal tem impacto significativo em populações de abelhas de várias espécies (Sgolastra et al., 2020). Não menos preocupantes são os efeitos subletais, que ocorrem quando os polinizadores são expostos a doses de agrotóxicos que não resultam em morte rápida dos insetos, mas que podem afetar o comportamento (Potts, 2010; Henry et al., 2012; Matsumoto, 2013), a aprendizagem (Decourtye et al., 2004; Goulson et al., 2015), o desenvolvimento de

colônias (Wu et al., 2011; Stanley et al., 2015), a viabilidade espermática (Chaimanee et al., 2016) e aumentar a suscetibilidade a diversos patógenos (Pettis et al., 2013).

Na ecologia e agricultura, o termo "deriva" é frequentemente empregado para descrever a dispersão inadvertida de agrotóxicos ou outros produtos químicos para locais que vão além do ponto de aplicação inicial. Essa dispersão pode ser atribuída a fatores como o tamanho das gotículas pulverizadas, ação do vento, evaporação e outras variáveis climáticas. Esse fenômeno pode resultar em consequências ecológicas indesejadas, como a poluição de corpos d'água e a exposição de espécies não-alvo, como os insetos polinizadores (Badiou-bénéteau et al., 2012; Zaluski et al., 2017). Para as abelhas, a deriva representa um perigo evidente, visto que esses insetos, ao deixarem suas colmeias em busca de alimento, água e ingredientes para a fabricação de própolis, podem ter contato direto ou indireto com essas substâncias (Couto e Couto, 2006; Sanchez-Bayo e Goka, 2014).

Entre os agrotóxicos, os fungicidas são amplamente utilizados para o controle de pragas e doenças na produção agrícola (Cullen et al., 2019). O início da busca pelo controle de fungos fitopatogênicos se deu há milhares de anos, quando produtos químicos inorgânicos à base de cobre e enxofre começaram a ser empregados no campo. Esses produtos são utilizados até hoje, mas a viabilidade de uso é restrita. Já em meados de 1930, foram desenvolvidos compostos orgânicos capazes de promover proteção de contato às plantas e, desde 1966, fungicidas sistêmicos têm sido utilizados para o combate mais específico e eficaz de determinados fungos, inclusive com ação curativa. Contudo, o uso recorrente desses fungicidas sistêmicos está associado a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, fazendo com que esses produtos se tornem menos eficientes ao longo do tempo (Russel, 2005).

Os fungicidas são comumente aplicados durante o período de floração, o que possibilita um contato direto com as abelhas enquanto elas realizam o forrageamento (Pettis et al., 2013; Schuhmann et al., 2022). Segundo Peterson et al. (2021), resíduos desses produtos químicos têm a capacidade de penetrar o exoesqueleto das abelhas e alcançar a hemolinfa. Uma vez dentro do organismo do

inseto, as moléculas podem ser canalizadas para o vaso dorsal, circulando pela hemolinfa por meio de contrações da região miogênica e ostíolos (aberturas) (Abdalla e Domingues, 2015).

Em análises de mel, pólen apícola e cera, têm-se verificado que os fungicidas são os agrotóxicos mais facilmente encontrados nas colmeias (Mussen et al., 2004; Fisher et al., 2017), estendendo a presença dessas moléculas além do período de floração (Mullin et al., 2010). Estudos como os de Pettis et al. (2013) e David et al. (2016) destacam a presença significativa de fungicidas em abelhas e colmeias. Os fungicidas têm sido associados a diversos efeitos subletais nas abelhas, tais como: alterações comportamentais (Artz e Pitts-Singer, 2015; Tadei et al., 2019), redução da longevidade de adultos (Fisher et al., 2017), alterações celulares e da microbiota intestinal (DeGrandi-Hoffman et al., 2017; Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020), alterações no sistema imunológico (Cizelj et al., 2016), efeitos adversos similares aos da má nutrição, que comprometem a colônia, tornando-a mais suscetível às infecções por patógenos (DeGrandi-Hoffman et al., 2015) e inibição da respiração mitocondrial, que pode implicar em menor capacidade de realizar trabalho (Nicodemo et al., 2020). Como o pão das abelhas é um alimento desenvolvido com a ajuda de microrganismos que fazem a sua fermentação, a chegada na colmeia de pólen apícola contaminado com fungicida pode prejudicar a qualidade desse alimento proteico. Além disso, há grandes chances das abelhas adultas que se alimentaram com alimento contaminado com fungicida na fase de cria ou durante a fase de nutrízes tenham sua sobrevivência reduzida (Carneiro et al., 2020) ou se tornem mais suscetíveis a certas doenças, como a *nosemose* (Pettis et al., 2013; Glavinic et al., 2019).

No mercado brasileiro, alguns fungicidas com três princípios ativos foram registrados para uso agrícola, em várias culturas. De acordo com Godoy et al. (2017), os principais fungicidas sítio-específico utilizados são os inibidores da desmetilação/síntese de ergosterol (IDM – triazóis), os inibidores da succinato desidrogenase (ISDH - carboxamidas) e os inibidores da quinona externa (IQe - estrobilurinas). Dentre esses produtos, destaca-se o fungicida Fox® Xpro, fungicida mesostêmico e sistêmico, que contém os princípios ativos bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina, respectivamente dos grupos químicos carboxamida, triazolintiona e

estrobilurina, utilizado de maneira preventiva, sendo indicado para o controle de doenças nas culturas do algodão, cevada, feijão, girassol, milho, soja e trigo (Dekker, 1995; Agrofit, 2023).

1.4.1 O fungicida bixafem

As mitocôndrias, organelas intracelulares presentes na maioria das células eucarióticas, desempenham funções cruciais, incluindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) - a principal molécula energética da célula - através da fosforilação oxidativa; participam do controle dos níveis de cálcio intracelular; estão envolvidas na síntese de lipídeos e na degradação de ácidos graxos via β -oxidação e regulam a apoptose, um processo de morte celular programada (Alberts et al., 2008).

O bixafem pertence ao grupo químico das carboxamidas, fungicida que interfere na cadeia de respiratória, inibindo a enzima succinato desidrogenase (SDHI), que é responsável pela transferência de elétrons no complexo II da mitocôndria do fungo. O complexo II faz parte de um conjunto de proteínas presentes na membrana interna das mitocôndrias, que desempenham o processo de respiração celular, no ciclo do ácido cítrico e no transporte de elétrons, sendo essencial para produção de ATP. Ao inibir o complexo II, o bixafem impede que os elétrons sejam transportados eficientemente através da cadeia de transporte de elétrons, ocasionando uma redução na produção de ATP. Como resultado, as células fúngicas são incapazes de produzir energia suficiente para manterem suas atividades vitais, o que pode levar ao seu enfraquecimento e eventual morte (Oliver e Hewitt, 2014; Frac, 2019).

O bixafem é um fungicida de nova geração, possuindo ação mesostêmica (translaminar) e sistêmica, com isso tem sido amplamente utilizado na agricultura, devido sua eficácia no controle doenças fúngicas em diversas culturas, incluindo cereais, como trigo e cevada (Oliver e Hewitt, 2014; Reis et al., 2017). Os efeitos do bixafem sobre insetos polinizadores ainda não são amplamente conhecidos, contudo, pesquisas conduzidas com outro fungicida do grupo das carboxamidas em abelhas, demonstraram que a boscalida pode diminuir a expectativa de vida (Simon-Delso et al., 2018), comprometer a frequência de batidas de asas durante o voo (Liao et al., 2019) e apresentar efeito sinérgico, intensificando sua toxicidade quando associada a outros agrotóxicos (Tsvetkov et al., 2017).

1.4.2 O fungicida trifloxistrobina

A trifloxistrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas. As estrobilurinas são uma classe de fungicidas que atuam como inibidores de quinona externa (IQE), atuando na inibição da coenzima Q-citocromo c-redutase, sítio químico da quinona oxidada, responsável pela transferência de elétrons no complexo III, resultando na paralisação da respiração mitocondrial na cadeia transportadora de elétrons, bloqueando o fluxo no citocromo bc1, interferindo na síntese de ATP. O complexo III é essencial para a produção de ATP. Ao inibir esse complexo, a trifloxistrobina impede que as células fúngicas produzam energia suficiente, levando a um enfraquecimento e, eventualmente, à morte das células fúngicas (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017).

A trifloxistrobina possui ação translaminar e preventiva, portanto, as aplicações devem ser realizadas preferencialmente em estágio pré-infeccional, sendo usada para controlar várias doenças fúngicas em culturas, incluindo frutas, vegetais e cereais. É especialmente eficaz contra fungos que causam doenças nas folhas e frutos. (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017; Frac, 2019).

Em decorrência da necessidade de utilização de fungicidas em práticas agrícolas, pesquisas vem sendo conduzidas para avaliar seus impactos sobre as abelhas. Segundo Tadei et al. (2019), a piraclostrobina, do mesmo grupo químico das estrobilurinas ocasionou danos no intestino médio e inibiu a respiração mitocondrial em abelhas melíferas. No estudo de Silva-Neto et al. (2018), a trifloxistrobina ocasionou uma taxa de mortalidade expressiva e exibiu propriedades repelentes em relação às abelhas *Melipona quadrifasciata*, que desempenham um papel crucial como agentes polinizadores na cultura do tomate e outras que necessitam que suas flores sejam vibradas para que ocorra a liberação dos grãos de pólen pelas anteras.

No entanto, evidencia-se a necessidade de expandir essas investigações para compreender os efeitos dessas substâncias no estresse oxidativo desses insetos de vital importância.

1.4.3 O fungicida protioconazol

A membrana celular, conhecida como membrana plasmática, é uma estrutura fina semipermeável que envolve a célula. Constituída principalmente por

fosfolipídios, proteínas e carboidratos, ela separa o conteúdo interno da célula do ambiente extracelular, sendo suas funções: barreira protetora; regulação do transporte de nutrientes, íons e resíduos; reconhecimento e sinalização de moléculas específicas; sítios de ancoragem e participação em reações bioquímicas (Alberts et al., 2008).

Na década de 1970, a indústria agroquímica introduziu no mercado os fungicidas triazóis, que agem no controle fúngico ao interferir na formação da membrana celular dos fungos (Brauer et al., 2019). O protriocanazol, lançado em 2004, sendo o mais recente pertencente a esse grupo químico, atua na inibição de esteróides são divididos em dois subgrupos: inibidores da desmetilação do C-14 (triazóis) e inibidores de D-isomerase e D-redutase. Quando essas moléculas entram em contato com as células fúngicas, ocorre o acúmulo de esteróides, inibindo a passagem de lanosterol para 24-metilenodihidrolanosterol e a subsequente desmetilação na posição C-14, resultando na inibição do citocromo P-450. Isso leva à formação de compostos metilados em vez de ergosterol e outros esteróides, que não conseguem desempenhar funções específicas na célula fúngica. Esse desequilíbrio de lipídeos nas membranas fúngicas resulta na inibição de fosfolipídeos, acúmulo de ácidos graxos livres e, eventualmente, na morte dos fungos. O protriocanazol atua como protetor e erradicante, inibindo a germinação de esporos, formação de tubo germinativo e apressório. Além disso, ele apresenta ação curativa, inibindo o desenvolvimento micelial e de haustórios (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017; Frac, 2019).

O protriocanazol é eficaz contra uma ampla gama de patógenos fúngicos, incluindo aqueles que causam ferrugem, oídio e manchas foliares em culturas como cereais, soja e algodão (Frac, 2019). Assim como outros agrotóxicos, é importante considerar o impacto ambiental do protriocanazol, incluindo os possíveis efeitos sobre os polinizadores. Como discutido anteriormente, os fungicidas podem ter efeitos indiretos e subletais sobre as abelhas. Os fungicidas podem estar presentes no pólen e no néctar das flores, que são coletados pelas abelhas e levados para a colmeia.

Embora não haja evidências específicas de que o protriocanazol seja altamente tóxico para as abelhas, estudos sugerem que alguns fungicidas do grupo

químico do triazóis podem afetar o comportamento das abelhas e sua resistência a doenças (Pettis et al., 2013; Fisher et al., 2017). Além disso, como mencionado anteriormente, a combinação de diferentes agrotóxicos, incluindo fungicidas, pode resultar em efeitos sinérgicos e potencialmente prejudiciais para as abelhas (Sgolastra et al., 2020).

1.5. Sistema antioxidante celular e estresse oxidativo em abelhas

O funcionamento celular é um processo complexo e precisamente regulado, o qual desempenha um papel vital em quase todos os aspectos da vida. As células, as unidades básicas da vida, são encarregadas de executar inúmeras funções vitais, necessárias para a sobrevivência e operação correta dos organismos vivos (Barreiro et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Um dos princípios fundamentais que guiam o funcionamento celular é a busca pela estabilidade interna, conhecida por homeostase. Esse processo permite que as células e os organismos mantenham um equilíbrio interno, ajustando-se a variações nas condições externas, tais como mudanças na temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH, pressão osmótica e outros fatores ambientais (Barreiro et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

O papel dos radicais livres é um exemplo de um processo contínuo e fisiológico que tem um lugar central no funcionamento celular. Cumprindo funções biológicas significativas, os radicais livres servem como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Quando produzidos em quantidades adequadas, possibilitam a geração de ATP (energia), fertilização do óvulo, ativação de genes, e desempenham um papel nas defesas durante as infecções. No entanto, a produção excessiva pode resultar em danos oxidativos (Bianchi e Antunes, 1999; Barreiro et al., 2006).

Esse entendimento levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, cuja finalidade é limitar os níveis de espécies reativas intracelulares e prevenir danos subsequentes (Ferreira e Matsubara, 1997). O desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorece a produção excessiva de radicais livres ou a remoção lenta. Esse processo pode oxidar biomoléculas, levando à perda de suas funções biológicas e desequilíbrios homeostáticos, manifestando-se como potenciais danos oxidativos às células e tecidos (Ferreira e Matsubara, 1997).

Para alcançar e manter a homeostase, as células operam sistemas

regulatórios sofisticados que monitoram continuamente as condições internas e respondem de forma adequada às mudanças do ambiente (Barreiro et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Essas estratégias incluem a regulação da expressão gênica, produção de enzimas específicas, transporte ativo de íons e moléculas, e a comunicação intercelular através de mensagens químicas (Barreiro et al., 2006). No entanto, mesmo com esses mecanismos de regulação eficazes, podem surgir situações em que as células são expostas a fatores estressantes, como agentes oxidantes em excesso, levando ao estado conhecido como estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010). O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes que ocasiona geração excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio – ERO, causando potencial dano oxidativo contra as células e tecidos. As ERO mais relevantes são o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ERO formadas primariamente, sendo que o H_2O_2 é gerado por meio da dismutação (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1989; Droge, 2002; Williams et al., 2008).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes para limitar os níveis intracelulares dessas substâncias para prevenir danos (Sies, 1993). Os antioxidantes são agentes que atuam inibindo e reduzindo as lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma definição abrangente de antioxidante é "qualquer substância que, em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, retarda ou inibe efetivamente a oxidação desse substrato" (Sies e Stahl, 1995).

Os agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos são obtidos por meio da alimentação e não são produzidos pelo organismo, incluindo a vitamina E, vitamina C, flavonoides, β -caroteno, proteínas do plasma, selênio, glutatona, clorofilina, L-cisteína e curcumina. Por outro lado, os antioxidantes enzimáticos são produzidos pelo próprio organismo e incluem a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD),

glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GSH) e a peroxidação lipídica (LPO) (Sies, 1993; Sies e Stahl, 1995).

As vitaminas C e E atuam na proteção das membranas lipídicas contra danos oxidativos (Buettner, 1993). A GSH, por sua vez, é um tripeptídeo presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister e Anderson, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, e quando um agente oxidante é inativado, ocorre a produção de glutathione oxidada (GSSG). Em condições normais, o sistema antioxidante é capaz de recuperar a GSH. No entanto, em situações de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre um desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo. A razão GSH/GSSG pode ser utilizada como um marcador desse estresse oxidativo (Owen e Butterfield, 2010).

A enzima CAT ou catalase, catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, tendo papel importante sobre a eliminação do H_2O_2 citosólico (Badiou-bénéteau et al., 2012). A enzima SOD catalisa a conversão do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que são menos reativos. O peróxido de hidrogênio é então convertido em água e oxigênio por outras enzimas antioxidantes, como a CAT (Badiou-bénéteau et al., 2012).

Nas mitocôndrias, o H_2O_2 é convertido em H_2O pela ação da glutathione peroxidase (GPx) (Mannervik, 1985). A manutenção dos níveis adequados de GSH é realizada pela atividade da glutathione reductase (GR), que utiliza equivalentes redutores no NADPH. O NADPH pode ser produzido pela via das pentoses fosfato ou por meio de enzimas transidrogenases (Meister e Anderson, 1983; Hyne e Maher, 2003; Ribeiro et al., 2005; Balieira et al., 2018). Já a peroxidação lipídica refere-se ao processo oxidativo dos lipídios poliinsaturados. Esses lipídios são caracterizados por possuírem duas ou mais ligações duplas entre átomos de carbono ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$) e são especialmente suscetíveis ao ataque de radicais livres, que ocasionam danos celulares (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Alguns bioindicadores enzimáticos são particularmente utilizados para avaliar os efeitos fisiológicos dos estressores ambientais. CAT, GST e SOD são as três principais enzimas sequestradoras de ERO e antioxidantes em abelhas

melíferas; pois, desempenham papéis importantes na defesa antioxidante em abelhas expostas a estressores bióticos e abióticos. Essas enzimas atuam para manter as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (Weirich et al., 2002; Balieira et al., 2018).

O metabolismo aeróbico gera continuamente ERO, que podem causar danos oxidativos aos componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana. Para evitar os efeitos indesejados de ERO, os organismos desenvolveram uma rede complexa de sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Farjan et al., 2012). Pesquisadores têm analisado o efeito dos fungicidas sobre o sistema antioxidante das abelhas. Le Bourg (2001) sugere que abelhas nutrízes expostas ao fungicida piraclostrobina e ao inseticida fipronil podem apresentar maior susceptibilidade ao estresse oxidativo devido à redução de enzimas antioxidantes. Morimoto et al., (2011) sugere que a redução dos genes associados ao sistema antioxidante, reduz a capacidade de defesa contra ERO e aumenta o estresse oxidativo em abelhas. Portanto, fornecer às colônias uma dieta de alta qualidade nutricional e sem restrição quantitativa pode contribuir para que haja maior resistência desses indivíduos aos agrotóxicos (Schmehl et al., 2014).

2. Objetivos

Promover condições nutricionais distintas entre dois grupos de colônias de abelhas melíferas, por meio da suplementação da alimentação de um grupo com ingredientes energéticos e proteicos e a restrição alimentar do segundo grupo, por meio do uso de coletores de pólen.

Avaliar os efeitos da alimentação de abelhas durante os primeiros cinco dias de vida com pólen oriundo de plantas de girassol tratados com fungicida à base de bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina, de acordo com as recomendações agronômicas, no que diz respeito às atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), bem como a concentração dos oxidantes não enzimáticos glutathione reduzida (GSH), nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), glutathione oxidada (GSSG), e a presença de lipoperoxidação, considerando-se o manejo alimentar prévio das colônias nas quais as abelhas foram obtidas.

Referências

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: a novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **PLoS One**, v. 10, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132349>>
- AIZEN, M. A.; AGUIAR, S.; BIESMEIJER, J. C.; GARIBALDI, L. A.; INOUE, D. W.; JUNG, C.; MARTINS, D. J.; MEDEL, R.; MORALES, L. C.; NGO, H.; PAUW, A.; PAXTON, R. J.; SÁEZ, A.; SEYMOUR, C. L. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. **Global Change Biology**, v. 25, n. 10, p. 3516-3527, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/gcb.14736>>
- AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/fox-xpro_10447.html>. Acesso em 17/06/2023.
- ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 562-565, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.
- ARTZ, D.R.; PITTS-SINGER, T.L. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PLoS ONE**, 10(8), 2015, p. e0135688. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135688>>
- ASCHER, J. S.; PICKERING, J. Discover Life: Bee species guide and global checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila), 2012.
- ASENCOT, M.; LENSKEY, Y. The effect of crystals in stored royal jelly and juvenile hormone on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. In: **CONGRESS OF IUSSI**, 8, Wageningen, s.ed., 1977. p.5-10.
- BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. P. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 82, p. 22–31, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005>>
- BAKER, H. G.; BAKER, I. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. (eds.). **The Biology of Nectaries**. Columbia University Press, New York, 1983. p. 126-152.

BALIEIRA, K. V. B.; MAZZO, M.; BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie**, 49, 562–572, 2018.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. DE C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23(4), 629–643, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>>

BARKER, R. J. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. **Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1859-1862, 1977.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARKER, R. J.; LEHNER, Y. Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Experimental Zoology**, v. 187, p. 277-285, 1974.

BATISTA, A.C.; DOMINGUES, C.E.C.; COSTA, M.J.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Is astrobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**; v. 59, n. 5, pp.1-10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>>

BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **BeeWorld**, v.60, p.24-39, 1979.

BESHERS, S. N.; FEWELL, J. H. Models of division of labor in social insects. **Annu Rev Entomol**, v. 46, p. 413-440, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.413>>

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.

BRAUER, V. S.; REZENDE, C. P.; PESSONI, A. M.; DE PAULA, R. G.; RANGAPPA, K. S.; NAYAKA, S. C.; GUPTA, V. K.; ALMEIDA, F. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 521, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biom9100521>>

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), 2007.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.

BRODSCHNEIDER, R.; GRAY, A.; ADJLANE, N.; BALLIS, A.; BRUSBARDIS, V.; CHARRÈRE, J. D.; CHLEBO, R.; COFFEY, M. F.; DAHLE, B.; DE GRAAF, D. C.; DRAŽIĆ, M. M.; EVANS, G.; FEDORIAK, M.; FORSYTHE, I.; GREGORC, A.; GRZĘDA, U.; HETZRONI, A.; KAUKO, L.; KRISTIANSEN, P.; DANIHLÍK, J. Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 3, p. 452–457, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1460911>>

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid, peroxidation, trocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

BUTLER, C.G.; FAIREY, E.M. Pheromones of the honeybee: biological studies of the mandibular gland secretion of the queen. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, n. 2, p. 65-76, 1964.

CAPPELLARI, S. C.; SCHAEFER, H.; DAVIS, C. C. Evolution: Pollen or Pollinators -Which Came First? **Current Biology**, v. 23, p. R316-R318, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.049>>

CARNEIRO, L.S.; MARTÍNEZ, L.C.; GONÇALVES, W.G.; SANTANA, L.M.; SERRÃO, J.E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target worker honey bees *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, article 109991, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>>

CARRECK, N.; NEUMANN, P. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

CHAIMANEE, V.; EVANS, J. D.; CHEN, Y.; JACKSON, C.; PETTIS, J. S. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. **Journal of Insect Physiology**, v. 89, p. 1-8, 2016.

CIZELJ, G.I.; OLIVEIRA, J.; BOŽIĆ, I.; FORNO, M.; RIBEIRO, V.; NARAT, M. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide biochemistry and physiology**, 128, pp. 68-75, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.015>>

COUTO, L. A. Nutrição de abelhas. In: **XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, Salvador, BA, p. 92-95, 1998.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 193 p, 2006.

CRAILSHEIM, K. The protein balance of the honey bee worker. **Apidologie**, v. 21, p. 417-429, 1990.

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

CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, L.H.W.; HRASSNIGG, G.; BÜHLMANN, G.; BROSCH, U.; GMEINBAUER, R.; SCHÖFFMANN, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, 38 (6), 409-419, 1992.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. Routledge, 1999.

CREMONEZ, T. M.; DE JONG, D.; BITONDI, M. M. G. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 1284-1288, 1998.

CREMONEZ, T. M. **Influência da nutrição sobre aspectos da fisiologia e nutrição de abelhas *Apis mellifera***. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 87 p, 2001.

CULLEN, M. G., OLIVEIRA, J. C., CAROLAN, J. C., STOUT, D. A., STANLEY, F. Fungicidas, herbicidas e abelhas: uma revisão sistemática das pesquisas e métodos existentes. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 14, n. 12, p. e0225743, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225743>>

DANFORTH, B. N.; CARDEAL, S.; PRAZ, C.; ALMEIDA, E. A.; MICHEZ, D. The impact of molecular data on understanding the phylogeny and evolution of bees. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 57-78, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-15363>>

DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; NICHOLLS, E.; ROTHERAY, E. L.; HILL, E. M.; GOULSON, D. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. **Environment International**, v. 88, p. 169-178, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>>

DE GROOT, A. P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Comparative Physiology and Ecology**, n. 3, p. 197-285, 1953.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DÈLÈGUE, M.-H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 410-419, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.001>>

DEGRANDI-HOFFMAN, G., GAGE, S. L., CORBY-HARRIS, V., CARROLL, M., CHAMBERS, M., GRAHAM, H., WATKINS DEJONG, E., HIDALGO, G., CALLE, S., AZZOUZ-OLDEN, F., MEADOR, C., SNYDER, L., & ZIOLKOWSKI, N. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology**, 109, 114–124, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>>

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; WATKINS DEJONG, E.; CHAMBERS, M.L.; HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, 2015, pp. 2518-2528. Disponível em: <<https://www.doi.org/10.1093/jee/tov251>>

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CORBY-HARRIS, V.; DEJONG, E.W. et al. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, 48, pp. 340-352, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0478-y>>

DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR., H. (Ed.). Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action. 2. ed. New York. **VEB Gustav Fisher Verlag**, p. 23-38, 1995.

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.

DI PASQUALE, G.; SALIGNON, M.; LE CONTE, Y.; BELZUNCES, L. P.; DECOURTYE, A.; KRETZSCHMAR, A.; SUCHAIL, S.; BRUNET, J.; ALAUX, C. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? **PloS ONE**, v. 8, n. 8, p. e7, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>>

DIETZ, A. Initiation of Pollen Consumption and Pollen Movement Through the Alimentary Canal of Newly Emerged Honey Bees. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 1, p. 43-46, 1969. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/aesa/62.1.43>>

DOLEZAL, A. G.; TOTH, A. L. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. **Current Opinion in Insect Science**, [s.l.], v. 26, p. 114-119, 2018.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ELLIS, A. M.; HAYES, G. W. Jr. An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 48, p. 215-216, 2009.

ENGELS, W., KAATZ, H.H., ZILLIKENS, A., SIMÕES, Z.L., TRUBE, A., BRAUN, R.H., DITTRICH, F., HOSHI, M., YAMASHITA, O. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste - specific regulation of fertility. **Advances in Invertebrate Reproduction**. [S.l.]:Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1990.

FARJAN, M.; DMITRYJUK, M.; LIPÍŃSKI, Z.; BIERNAT-ŁOPIEŃSKA, E.; ŻÓŁTOWSKA, K. Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 3, p. 263-270, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.07>>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FISHER, A.; CARVALHO, C. U.; OLIVEIRA, C.; RIBEIRO, B.; OLIVEIRA, J.; RANGEL, E. Synergistic effects of almond protective fungicides on the survival of bee foragers (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 110, 2017, pp. 802-808. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/tox031>>

FRAC. **Informações sobre triazóis, estrobilurinas e carboxamidas em ferrugem da soja**. 3 p. (Informativo 01/2019). Disponível em: <<https://www.frac-br.org/soja>> Acesso em: 20/jun/2023.

FREE, J.B. **Pheromones of social bees**. London: Chapman and Hall, 1987.

GLAVINIC, U.; TESOVNIK, T.; STEVANOVIC, J.; ZORC, M.; CIZELJ, I.; STANIMIROVIC, Z.; NARAT, M. Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. **PeerJ** 7:e6325 Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.6325>>

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; LOPES, I. de O. N.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MADALOSSO, T.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja**, 12 p, 2017.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n.6229, p. 1255957, 2015.

GRAY, A.; BRODSCHNEIDER, R.; ADJLANE, N.; BALLIS, A.; BRUSBARDIS, V.; CHARRÈRE, J. D.; CHLEBO, R.; COFFEY, M. F.; CORNELISSEN, B.; AMARO DA COSTA, C.; CSÁKI, T.; DAHLE, B.; DANIHLÍK, J.; DRAŽIĆ, M. M.; EVANS, G.; FEDORIAK, M.; FORSYTHE, I.; DE GRAAF, D.; GREGORC, A.; SOROKER, V. Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 4, p. 479–477, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661>>

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. Insetos: fundamentos da entomologia. 5. ed. Rio de Janeiro: **Roca**, 2017.

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

HAGEDORN, H. H.; MOELLER, F. E. The Rate of Pollen Consumption by Newly Emerged Honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, n. 3, p. 159-162, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100176>>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: **Clarendon**, p. 543, 1989.

HAYDAK, M. H. Causes of deficiency of soybean flour as a pollen substitute for honeybees. **Journal of Economic Entomology**, v. 42, p. 573-579, 1949. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/42.4.573>>

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.

HAYDAK, M.H. Larval food and development of castes in the honeybee. **Journal of Economic Entomology**, v. 36, n.5, p.778-792, 1943.

HENRY, M., BÉGUIN, M., REQUIER, F., ROLLIN, O., ODOUX, J.-F., AUPINEL, P., APTEL, J., TCHAMITCHIAN, S., DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science** (New York, N.Y.), 336(6079), 348–350. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1215039>>

HERBERT JR., E. W.; SHIMANUKI, H.; CARON, D. Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera: Apidae) to initiate and maintain brood rearing. **Apidologie**, v. 8, p. 141-146, 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:19770204>>

HERBERT, E. W. Jr. Honey bee nutrition. In: GRAHAM, J. M. (ed). **The Hive and The Honey Bee**. Hamilton, Illinois: Dadant & Sons, p. 197-233, 1992.

HERBERT, E. W. Jr.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of beecollected and bee stored pollen. **Apidologie**, v. 9, p. 33-40, 1978.

HERNÁNDEZ, J., RIVEROS, A.J., AMAYA-MÁRQUEZ, M. Sublethal doses of glyphosate impair olfactory memory retention, but not learning in the honey bee (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of Insect Conservation**, 25, 683–694, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10841-021-00335-6>>

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 36, p. 255-277, 2005.

HUANG, Z. Honey bee nutrition. **American Bee Journal**, v. 150, n. 8, p. 773-776, 2010.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 39, p. 147-158, 1996.

HUNG, K.-L. J.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, M.; PEREIRA, A. D.; OLIVEIRA, J. R. A importância mundial das abelhas melíferas como polinizadoras em habitats naturais. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, p. 20172140, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>>

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links with toxicity predicting population decline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54, 366-374, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00119-7)>

JAY, S.C. The development of honeybee in their cells. **Journal of Apicultural Research**, v.2, p.117-34, 1963.

JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity – U.S.A. **Apidologie**, 41, 312-331, 2010.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v.473, p.478-483, 2011.

KLEIN, A.-M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANA, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for global crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>>

KLEIN, S.; CABIROL, A.; DEVAUD, J. M.; BARRON, A. B.; LIHOREAU, M. Why bees are so vulnerable to environmental stressors? **Trends in Ecology & Evolution**, 32,268-278, 2017.

LE BOURG, E. Oxidative stress, aging, and longevity in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, 498, 183-186, 2001.

LIAO, L.-H.; WU, W.-Y.; DAD, A.; BERENBAUM, M.R. Fungicide suppression of flight performance in the honeybee (*Apis mellifera*) and its amelioration by quercetin. **Proc.R. Soc. B: Biol. Sci.**, v. 286, p. 20192041, 2019.

LIMA, M. C.; ROCHA, S. de A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: **Ibama**, 80 p, 2012.

LINGUADOCA, A., RIZZI, C., VILLA, S., & BROWN, M.J. Sulfoxaflor and nutritional deficiency synergistically reduce survival and fecundity in bumblebees. **Science of the Total Environment**, v. 795, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148680>>

MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 490-495, 1985.

MAO, W.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 10, p. 2538-2543, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>>

MATSUMOTO, T. Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. **Bulletin of Insectology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2013.

MATTILA, H. R.; OTIS, G. W. Effects of pollen availability and *Nosema* infection during the spring on division of labour and survival of worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v. 35, p. 708-717, 2006.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosemaceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, 100, 185–188, 2009.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MICHENER, C. D. The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study. Reino Unido: **Belknap Press of Harvard University Press**, 1974.

MORIMOTO, T.; KOJIMA, Y.; TOKI, T.; KOMEDA, Y.; YOSHIYAMA, M.; KIMURA, K.; NIRASAWA, K.; KADOWAKI, T. The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 201-217, 2011. ISSN 2045-7758. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ece3.21>>

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. **PloS ONE**, 5(3): e9754. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>>

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). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 5, p. 1151-1154, 2004.

NAUG, D.; GIBBS, A. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. **Apidologie**, 40, 595–599, 2009.

NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E.; DE JONG, D.; BIZERRA, P. F. V.; TAVARES, M. A.; BELLINI, W. C.; VICENTE, E. F.; DE CARVALHO, A. Mitochondrial Respiratory Inhibition Promoted by Pyraclostrobin in Fungi is Also Observed in Honey Bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1267-1272, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4719>>

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 144, p.31-43, 2006.

OLIVER, R.; HEWITT, H. G. Fungicides in crop protection. 2.ed. Boston: **CABI**, 189p, 2014.

OWEN, J. B.; BUTTERFIELD, D. A. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. **Methods in Molecular Biology**. v. 648, p. 269-277, 2010.

PAGE, R. E.; PENG, Y.-S. C. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 695-711, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)>

PENG, Y.-S.C.; JAY, S.C. Larval rearing by worker honey bees lacking their mandibular glands. I. Rearing by small numbers of worker bees. **Canadian Entomology**, v.109, p.1175-80, 1977.

PETERSON, E. M.; GREEN, F. B.; SMITH, P. N. Toxic responses of blue orchard mason bees (*Osmia lignaria*) following contact exposure to neonicotinoids, macrocyclic lactones, and pyrethroids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111681>>

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, 8, 2013, Article e70182. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>>

PINTO, F. de A.; FERNANDES, R. O.; PODEROSO, J. C. M.; SANTANA, W. C.; MESSAGE, D. Nutritional and Temporal Effects on Hypopharyngeal Glands of Africanized Honeybees (Hymenoptera – Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, Brazil, v. 59, n. 2, p. 447–456, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.13102/sociobiology.v59i2.608>>

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, 345-353, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1460911>>

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their value to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.

REIS, M. R.; REIS, A. C.; ZANNATA, M.; SILVA, L. H.; SIQUERI, F. V. Evolução da redução da sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas e estratégia para recuperar a eficiência do controle, 3. Ed., rev. e atual. Passo Fundo: **Berthier**, 104 p, 2017.

REMBOLD, H. Die kastenentstehung bei der honigbiene, *Apis mellifica* L. **Naturwissenschaften**, v.51, p.49-54, 1964.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L.P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 637-665, 1992.

RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>>

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.

ROULSTON, T. H.; CANE, J. H. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1, p. 187-209, 2000.

ROULSTON, T.H.; BUCHMANN, S.L.; CANE, J.H. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? **Ecological Monographs**, v. 70, n. 4, p. 617–643, 2000.

RUEPPELL, O.; AUMER, D.; MORITZ, R. F. A. Ties between ageing plasticity and reproductive physiology in honey bees (*Apis mellifera*) reveal a positive relation between fecundity and longevity as consequence of advanced social evolution. **Current Opinion in Insect Science**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.009>>

RUSSELL, P. E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 143, p. 11–25, 2005.

SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; CABONI, M. F.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA- MURADIAN, L. Quality and standardisation of royal jelly. **Journal of Apiprodukt and Apimedical Science**, v. 1, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.1.04>>

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PloS ONE**, 9(4): e94482. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>>

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019. Available at: Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>>

SCHMEHL, D. R.; TEAL, P. E. A.; FRAZIER, J. L.; GROZINGER, C. M. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, 71, 177–190, 2014.

SCHMICKL, T.; CRAILSHEIM, K. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor conditions. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 51, p. 415-425, 2002.

SCHULZ, D. J.; HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E. Effect of colony food shortage on the behavioral development of the honey bee, *Apis mellifera*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 42, 295–303, 1998.

SCHUHMANN, A.; SCHMID, A. P.; MANZER, S.; SCHULTE, J.; SCHEINER, R. Interaction of Insecticides and Fungicides in Bees. **Frontiers in Insect Science**, v. 1, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>>

SEELEY, T. D. The Honey bee colony as a superorganism. **American Scientist**, v. 77, p. 546-553, 1989.

SGOLASTRA, F.; MĘDRZYCKI, P.; BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMON-DELISO, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, v. 241, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>>

SHI, G. Q.; ZHANG, Z.; JIA, K. L.; ZHANG, K.; AN, D. X.; WANG, G.; ZHANG, B. L.; YIN, H. N. Characterization and expression analysis of peroxiredoxin family genes from the silkworm *Bombyx mori* in response to phoxim and chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 114, 24-31, 2014.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **European Journal Of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315- 1321, 1995.

SILVA-NETO, C. de M. e; RIBEIRO, A. C. C.; GOMES, F. L.; NEVES, J. G.; MELO, A. P. C. de; CALIL, F. N.; NASCIMENTO, A. dos R.; FRANCESCHINELLI, E. V. Interação entre fungicidas biológicos e químicos e polinizadores de tomate. **Revista Colombiana de Ciências Horticolas**, v. 12, n. 2, p. 425–435, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7690>>

SIMON-DELISO, N.; MARTIN, G.; BRUNEAU, E.; HAUTIER, L. Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. **Scientific Reports**, v. 8, p. 7241, 2018.

SLESSOR, K. N.; WINSTON, M. L.; LE CONTE, Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 2731- 2745, 2005.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; ENDRESS, P. K.; CHASE, M. W. Phylogeny and Evolution of Angiosperms. **BioScience**, Volume 57, Issue 6, June 2007, Pages 537– 538. Disponível em: <<https://doi.org/10.1641/B570612>>

SOROYE, P.; NEWBOLD, T.; KERR, J. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. **Science**, v. 367, n. 6478, p. 685-688, 2020.

SOMERVILLE, Doug. Fast Bees, Skinny Bees: A manual on honey bee nutrition for bee keepers. Canderra, Australia: **Rural Industries Research & Development (RIRDC)**, 2005.

STANLEY, D. A.; GARRATT, M. P.; WICKENS, J. B.; WICKENS, V. J.; POTTS, S. G.; RAINE, N. E. Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 548-550, 2015.

STEINHAEUER, N.; KULHANEK, K.; ANTÚNEZ, K.; HUMAN, H.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHAUZAT, M. P.; VANENGELSDORP, D. Drivers of colony losses. **Current Opinion in Insect Science**, v. 26, p. 142-148, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>>

TADEI, R., DOMINGUES, C. E. C., MALAQUIAS, J. B., CAMILO, E. V., MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E. C. M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, 9(1), 3277, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>

TONG, L., NIEH, J.C., TOSI, S. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, 237, 124408, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124408>>

TOSI, S.; NIEH, J. C.; SGOLASTRA, F.; CABBRI, R.; MEDRZYCKI, P. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 284, 20171711, 2017. TOWNSEND, G.F.; SHUEL, R.W. Some recent advances in apicultural research. **Annual Review of Entomology**, v.7, p.481-99, 1962.

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT, O.; SOOD, K.; PATEL, H.S.; MALENA, D.A.; GAJIWALA, P.H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, v. 356, p. 1395-1397, 2017.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. **Journal of Apicultural Research**, v. 48, p. 189-195, 2009.

VAUDO, A.D.; TOOKER, J.F.; GROZINGER, C.M.; PATCH, H.M. Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 133-141, 2015.

WANG, Ying; MA, Lanting; ZHANG, Weixing; CUI, Xuepei; WANG, Hongfang; XU, Baohua. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v.47, p.48-56, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0374-x>>.

WEAVER, N. Control of dimorphism in the female honeybee. 2. Methods of rearing larvae in the laboratory and preserving royal jelly. **Journal of Apicultural Research**, v.13, p.3-14, 1974.

WEIRICH, G. F.; COLLINS, A. M.; WILLIAMS, V. P. Antioxidant enzymes in the honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, 33, 3-14, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:2001001>>

WILDE, J.; BEETSMA, J. The physiology of caste development in social insects. **Advances in Insect Physiology**, v.16, p.167-246, 1982.

WILLIAMS, J. B.; ROBERTS, S. P.; ELEKONICH, M. M. Age and naturally metabolically- intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. **Gerontol**, v. 43, p. 538-549, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.001>>

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, 276p, 2003.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1991.

WINSTON, M. L.; SLESSOR, K. N. The essence of royalty: honey bee queen pheromone. **American Scientist**, v. 80, n. 4, p. 374-385, 1992.

WINSTON, M. L.; TAYLOR, O. R.; OTIS, G. W. Some differences between temperate European and tropical African and South American honeybees. **Bee World**, v. 64, p. 12-21, 1983.

WRIGHT, G. A.; NICOLSON, S. W.; SHAFIR, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 327-344, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>>

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PloS ONE**, v. 6, p. e14720, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>>

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, 7, 15217, 2017.

ZAMBOLIM, L. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: UFV, p. 30-90, 2007.

ZUCOLOTO, F. S. Performance of *Apis mellifera* workers fed on natural and artificial diets (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 4, 1994.

2. CAPÍTULO 2 – Restrição alimentar e contaminação do pólen com fungicida de ação múltipla promovem estresse oxidativo e redução da longevidade em abelhas melíferas

RESUMO

As abelhas são essenciais para a polinização, contribuindo para a biodiversidade dos ecossistemas e produção agrícola. Recentemente, tem havido uma crescente preocupação com a saúde e longevidade das abelhas, com alguns fatores associados ao declínio de suas populações. Em áreas agrícolas, a abelha *Apis mellifera* tem sido exposta a agrotóxicos que podem causar efeitos adversos, especialmente quando associados a restrições nutricionais. Nesse contexto, torna-se fundamental compreender a interação entre nutrição e exposição a agrotóxicos no metabolismo das abelhas. O objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo em abelhas nutrízes alimentadas com pólen de girassol tratado com fungicida à base de bixafem, proclorazoxol e trifloxistrobina. Para tal, oito colônias de abelhas foram submetidas a dois manejos alimentares por 24 semanas: alimentação suplementada (S) com pasta proteica à base de pólen apícola e mel (4:1) + xarope energético com água e açúcar (1:1) e restrita (R). Abelhas nutrízes provenientes dessas colônias foram colocadas em gaiolas e alimentadas com pólen tratado (CF) ou não tratado com fungicida (SF). O metabolismo oxidativo das abelhas nutrízes foi analisado por meio da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), bem como a concentração dos oxidantes não enzimáticos glutatona reduzida (GSH), nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), glutatona oxidada (GSSG), e a presença de lipoperoxidação do tórax das abelhas e considerando-se o manejo alimentar prévio das colônias, foi avaliada a sobrevivência das abelhas, quantificada de acordo com o número de dias sob os tratamentos. A GPx teve maior atividade em abelhas das colônias S, mas seu desempenho diminuiu quando expostas ao fungicida. A atividade da CAT foi reduzida em abelhas de colônias S-CF. Não houve diferença significativa entre as colônias S-SF, R-CF e R-SF. A GSH foi maior em abelhas de colônias R. Não sendo afetada pela alimentação com fungicida. A GSSG apresentou maior concentração em colônias R-SF, sem diferenças significativas nos demais tratamentos. A relação entre GSH/GSSG, não foi alterada em nenhum dos tratamentos. A concentração da NAD(P)H foi maior em colônias S. A concentração de MDA foi maior em colônias CF. As abelhas de colônias S-SF tiveram a maior sobrevivência, enquanto aquelas expostas ao fungicida apresentaram menor expectativa de vida. A alimentação de abelhas com pólen contaminado pelo fungicida de tripla ação tem potencial de afetar, por si só, o metabolismo oxidativo e a sobrevivência das abelhas, sobretudo de abelhas nutrízes provenientes de colmeias com restrição alimentar.

Palavras-chave: bixafem; nutrição; oxirredução; proclorazoxol; trifloxistrobina.

2. CHAPTER 2 – Feed restriction and pollen contamination with multi-action fungicide promote oxidative stress and reduced longevity in honey bees

ABSTRACT

Bees are essential for pollination, contributing to the biodiversity of ecosystems and agricultural production. Recently, there has been a growing concern about the health and longevity of bees, with some factors associated with the decline of their populations. In agricultural areas, the *Apis mellifera* bee has been exposed to pesticides that can cause adverse effects, especially when associated with nutritional restrictions. In this context, it becomes essential to understand the interaction between nutrition and pesticide exposure in bee metabolism. The aim of this study was to evaluate oxidative stress in nurse bees fed with sunflower pollen treated with the fungicide based on bixafen, prothioconazole, and trifloxystrobin. For this purpose, eight bee colonies were subjected to two feeding regimes for 24 weeks: supplemented feeding (S) with protein paste made from bee pollen and honey (4:1) + energy syrup with water and sugar (1:1) and restricted feeding (R). Nurse bees from these colonies were placed in cages and fed with treated pollen (CF) or untreated pollen (SF). The oxidative metabolism of nurse bees was analyzed through the activity of antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), as well as the concentration of non-enzymatic oxidants reduced glutathione (GSH), pyridine nucleotides (NAD(P)H), oxidized glutathione (GSSG), and the presence of thorax lipoperoxidation. Taking into account the previous feeding management of the colonies, bee survival was evaluated, quantified according to the number of days under the treatments. GPx had higher activity in bees from the S colonies, but its performance decreased when exposed to the fungicide. CAT activity was reduced in bees from S-CF colonies. There was no significant difference between S-SF, R-CF, and R-SF colonies. GSH was higher in bees from R colonies and was not affected by fungicide feeding. GSSG showed higher concentration in R-SF colonies, with no significant differences in the other treatments. The GSH/GSSG ratio was not altered in any of the treatments. The concentration of NAD(P)H was higher in S colonies. The concentration of MDA was higher in CF colonies. Bees from S-SF colonies had the highest survival, while those exposed to the fungicide had a shorter lifespan. Feeding bees with pollen contaminated by the triple-action fungicide has the potential to affect oxidative metabolism and bee survival on its own, especially for nurse bees from colonies with restricted feeding.

Keywords: bixafen; nutrition; prothioconazole. redox; trifloxystrobin.

2.1. Introdução

As abelhas desempenham um papel vital na polinização e, consequentemente, na manutenção da biodiversidade dos ecossistemas naturais e na produção agrícola (Potts et al., 2018). A preocupação com a saúde e a longevidade das abelhas tem aumentado, com diversos fatores sendo associados ao declínio das populações desses insetos polinizadores (Hernández et al., 2021). A abelha melífera (*Apis mellifera*), é uma importante polinizadora de culturas em todo o mundo, sendo frequentemente exposta a vários agrotóxicos em áreas agrícolas (Poquet et al., 2016). Ao frequentarem plantações pulverizadas ou outras áreas atingidas pela deriva de agrotóxicos, as abelhas podem ser contaminadas. O problema pode ser maior quando são aplicados dois produtos são usados simultaneamente ou um produto que possui mais de um princípio ativo, como ocorre em alguns fungicidas (Böhme et al., 2017; Prado et al., 2019; Rondeau e Raine, 2022).

Os fungicidas são considerados as substâncias menos tóxicas para as abelhas, com base em testes de toxicidade aguda, porém, esses testes não consideram efeitos subletais. A exposição a fungicidas pode ocasionar alterações comportamentais (Tadei et al., 2019), celulares (Batista et al., 2020), microbianas (Carneiro et al., 2020) e imunológicas (Cizelj et al., 2016), além de impactar negativamente a longevidade dos adultos (Fisher et al., 2017) e o consumo de alimento de crias e adultos (Liao et al., 2017; Mao et al., 2017; Cizelj et al., 2016).

Face ao estresse à saúde das abelhas decorrente da intoxicação com fungicidas, é pertinente a consideração da condição nutricional das colônias, uma vez que a paisagem disponível para as abelhas forragearem foi demasiadamente alterada, tornando, em alguns casos, a dieta das abelhas restrita em quantidade e ou qualidade nutricional (Fisher et al., 2023). O pólen é um alimento de origem floral primordial para as abelhas, que contém uma rica fonte de proteínas, aminoácidos, lipídios, amido, esteróis, vitaminas e minerais que são fundamentais para o desenvolvimento das abelhas (Corona et al., 2023). A deficiência na oferta de pólen pode resultar em redução da população da colônia e comprometer a saúde dos seus indivíduos, diminuindo a resistência a estresses bióticos e abióticos (Fisher et al., 2023; Corona et al., 2023).

Neste cenário de uso intensivo de agrotóxicos e paisagens com limitações espaciais e temporárias de recursos alimentares para as abelhas, o atendimento nutricional destes insetos benéficos deve ser avaliado com maior atenção, pois ele é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência em todos os estágios de vida e está intrinsecamente ligado à capacidade de resistência do organismo frente a vários agentes estressores, como os agrotóxicos (Wickramasinghe et al. 2020). Além disso, a melhor compreensão da interação entre nutrição, exposição a agrotóxicos e funcionamento do sistema antioxidante das abelhas é crucial, considerando-se que já foram constatados prejuízos à saúde das abelhas que impactam o seu comportamento, desempenho produtivo e longevidade no estudo da associação entre contaminação por agrotóxico e restrição alimentar, gerando estresse oxidativo (Tong et al., 2019; Fisher et al., 2023).

Um fungicida de tripla ação, contendo os princípios ativos bixafen, prothioconazol e trifloxistrobina, tem sido comumente utilizado na prática agrícola de grandes culturas, como algodão, girassol e soja (Bayer, 2019), que são culturas visitadas pelas abelhas para a coleta de pólen e ou néctar, e que podem ter suas safras aumentadas em decorrência da polinização entomófila (Klein et al., 2007). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos isolados e em conjunto destes princípios ativos na saúde das abelhas, principalmente no que diz respeito ao metabolismo oxidativo das abelhas melíferas nutrízes e na atividade de suas enzimas antioxidantes. O aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelulares ou falhas no sistema antioxidante levam ao estresse oxidativo, um estado prejudicial à sobrevivência celular. A geração de ERO é balanceada por desintoxicação enzimática e não enzimática. O estresse nutricional, como a restrição quantitativa ou a baixa qualidade do pólen disponível para as abelhas, é apontado como uma das causas do declínio das colônias, e antioxidantes enzimáticos presentes em dietas de melhor qualidade podem auxiliar na defesa antioxidante das abelhas (Mucci et al., 2021; Corona et al., 2023). Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o estresse oxidativo em abelhas nutrízes que receberam pólen de girassol oriundo de plantas tratadas com fungicida de tripla ação nos primeiros dias da fase adulta e que durante a fase de cria se desenvolveram em colônias com alimentação suplementada ou restrita.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado na FCAT – Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena, com coordenadas geográficas, 21°27'33" de Latitude Sul e 51°33'22" de Longitude Oeste e com altitude média de 392 metros.

2.2.2. Cultivo de girassol, tratamento com fungicida e obtenção de pólen

A semeadura de girassol (*Helianthus annuus* L.), da variedade CATI Multissol, foi conduzido em uma área de 3.000 m², com espaçamento de 0,45 m entre linhas e 0,40 m entre plantas (Figura 1). As adubações de plantio e cobertura foram realizadas conforme as recomendações de Raij et al. (1997), e não foram utilizados agrotóxicos para prevenir ou controlar pragas.



Figura 1. Área experimental com a cultura do girassol, cultivar CATI Multissol. Fonte: arquivo pessoal.

A fim de obter pólen das plantas de girassol e prevenir que as abelhas e outros insetos tivessem acesso às flores, centenas de inflorescências foram cobertas com sacos de TNT (Tecido Não Tecido) antes da antese das primeiras flores (Figura 2). Com a maioria das flores abertas, as flores foram cortadas das plantas e levadas para o laboratório.



Figura 2. Inflorescências de girassol antes da abertura das flores, com destaque para uma que estava protegida com saco de TNT (esquerda) e outra desprotegida (direita). Fonte: arquivo pessoal.

Em seguida, as inflorescências foram retiradas dos sacos de TNT e colocadas sobre o chão de uma área aberta, dispostas em mesmo espaçamento utilizado no campo. A área ocupada com as flores foi calculada para a determinação da quantidade de produto a ser aplicada. A aplicação do fungicida foi conduzida de acordo com as instruções fornecidas na bula do produto comercial do fungicida Fox Xpro (Bayer, 2019), para o controle de *Alternaria helianthi*, com 0,5L ha⁻¹ em 144 litros de calda por hectare, com equipamento de pulverização com pressão de 200 kPa, a 0,5 m de altura das flores, sem a presença de vento. Após quinze minutos, tempo necessário para que a calda secasse, as inflorescências foram recolhidas e

levadas de volta para o laboratório. Por meio de agitação manual, o pólen das flores direcionadas para baixo caiu sobre uma bandeja, sendo recolhido em tubos de 50 mL, que foram armazenados em ultrafreezer (-80°C). Para o grupo controle, o pólen foi obtido sem a aplicação do fungicida.

2.2.3. Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas

Foram utilizadas oito colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) instaladas em colmeias tipo Langstroth, submetidas a dois manejos alimentares por 24 semanas. Quatro colônias tiveram a sua alimentação suplementada (S), com 100g pastaproteica, preparada com três partes de pólen apícola e uma de mel, fornecida uma vez por semana, e 500 mL de xarope energético à base de água e açúcar em iguais proporções, oferecido duas vezes por semana.

O manejo alimentar do segundo grupo implicou em alimentação restrita das colônias (R), por meio da instalação de um coletor de pólen no alvado de cada uma das colmeias (Figura 3). As colônias deste grupo não receberam suplemento alimentar.



Figura 3. Colmeia tipo Langstroth (a), com coletor de pólen, em colônia do grupo de abelhas com alimentação restrita (R); gaveta com pólen apícola (b). Fonte: arquivo pessoal.

2.2.4. Coleta de pólen e eficiência dos coletores de pólen

O pólen apícola obtido por meio dos coletores de pólen instalados nas colmeias do grupo R foi recolhido diariamente durante as 24 semanas de manejo alimentar. Após cada coleta, o pólen apícola obtido de cada colônia foi pesado em balança semi-analítica. Foi calculada a quantidade semanal de pólen obtido em cada uma das colônias.

Para avaliar a quantidade de alimento proteico disponível para as colônias R, foi determinada a eficiência dos coletores de pólen. Um observador esteve próximo ao coletor de pólen da colônia em avaliação por 30 minutos, entre 8 e 10h, registrando a quantidade de abelhas que chegavam do campo com pólen nas corbículas. Após este período, as bolotas de pólen que estavam dentro da gaveta do coletor de pólen foram contadas. As observações foram feitas em duplicata em cada colmeia. Estes dados foram utilizados para se determinar a eficiência dos coletores de pólen, por meio da fórmula:

Eficiência do coletor de pólen =

$$n^{\circ} \text{ de bolotas de pólen} / (2 \times n^{\circ} \text{ de abelhas com pólen}) \times 100$$

2.2.5. Obtenção de abelhas recém emergidas e preparação das dietas experimentais

Para obter abelhas recém-emergidas, um quadro com abelhas prestes a nascer foi retirado de cada colônia, com o objetivo de formar um *pool* de abelhas originárias de cada um dos manejos alimentares (S e R). Gaiolas plásticas (Figura 4) com volume de 0,25L foram utilizadas para alojar 20 abelhas do mesmo grupo de manejo alimentar. As tampas das gaiolas estavam perfuradas para permitir troca gasosa. Em cada gaiola foi instalado um microtubo na tampa, que serviu de bebedouro e um microtubo na lateral da gaiola, utilizado como cocho para o alimento proteico.

Alimentos proteicos foram elaborados a partir de uma mistura contendo três partes de pólen de girassol oriundo de flores tratadas ou não com o fungicida em estudo e uma parte de mel. Foi preparado xarope energético contendo duas partes de açúcar e uma de água. Houve reposição diária dos alimentos, com registro

das quantidades consumidas diariamente de cada um dos alimentos, por meio de balança analítica.

Para a avaliação do metabolismo oxidativo, 320 abelhas permaneceram por cinco dias em 16 gaiolas (2 manejos alimentares das colônias, 2 dietas das abelhas recém emergidas, 4 repetições). As abelhas foram mantidas em incubadora com temperatura (33°C) e umidade (70%) controladas.



Figura 4. Gaiolas plásticas, com tampas furadas para troca gasosa; instalação de microtubos nas tampas, utilizados como bebedouros e microtubos nas laterais, utilizados como cochos para o alimento proteico. Fonte: arquivo pessoal.

2.2.6. Obtenção e dosagem de proteínas no homogenato do tórax

Após o período no qual as abelhas receberam as dietas experimentais, as gaiolas contendo as abelhas foram colocados em freezer por alguns minutos, para que as abelhas fossem anestesiadas. Em seguida, o tórax das abelhas foi separado das demais partes do corpo, inclusive pernas e asas, com auxílio de tesoura (Hoskinset al., 1956). Os tórax de abelhas da mesma gaiola foram colocados em um almofariz contendo o meio de isolamento (250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2), mantido a 4°C e macerados com pistilo de porcelana.

O homogenato obtido foi filtrado em gaze dobrada por oito vezes (Figura 5). A concentração de proteína total foi determinada utilizando a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), utilizando albumina de sérica bovina (BSA) como padrão.



Figura 5. Obtenção do homogenato de tórax de abelhas melíferas nutrízes. Fonte: arquivo pessoal.

2.3. Análise do estresse oxidativo em abelhas melíferas nutrízes

2.3.1. Atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de tórax

2.3.1.1. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutathione reduzida (GSH) para glutathione oxidada (GSSG), catalisada pela GPx, e a subsequente oxidação do NAD(P)H pela GSSG (Flohé e Günzler, 1984). O sistema de reação foi composto por 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NAD(P)H 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6), juntamente com o homogeneizado de tórax (abelhas) (1 mg de proteína/mL). A atividade enzimática foi avaliada a 30°C em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800, no comprimento de onda de 340 nm, e a oxidação de 1 μ mol de NAD(P)H/minuto foi utilizada como uma unidade de glutathione peroxidase. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína/minuto.

2.3.1.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase foi realizada com o

homogeneizado de tórax (abelhas) (1 mg de proteína/mL) em 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7). A reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de H_2O_2 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima necessária para decompor 1 μ mol de H_2O_2 por minuto, a 25°C e pH 7. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 a 230 nm. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína/minuto (AEBI, 1974).

2.4. Concentração de oxidantes não enzimáticos

2.4.1. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH no homogeneizado de tórax foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976), utilizando tubos do tipo "eppendorf" de 2 mL. Ao homogeneizado (1 mg de proteína), foi adicionado meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, para completar 1 mL. Após uma leve homogeneização, foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 minutos. Em tubos de ensaio de 5 mL, foram adicionados 1800 μ L de tampão contendo NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 μ L do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 μ L de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, com comprimento de onda de 350 nm para emissão e 420 nm para excitação, com abertura de fenda 3 em ambos os casos.

2.4.2. Determinação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG)

Para a dosagem de GSSG, 250 μ L do sobrenadante inicial foram tratados com 250 μ L de N-etilmaleimida (NEM) 0,04 M e submetidos ao mesmo procedimento de mistura com o OPT. As concentrações de GSH e GSSG foram estimadas utilizando uma curva padrão.

2.4.3. Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A determinação do estado oxidativo da NAD(P)H foi realizada no

homogeneizado de tórax. Amostras de homogeneizado (1 mg de proteína/mL) foram adicionadas a um meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, com um volume final de 2 mL. A leitura foi realizada em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, utilizando 366 nm para excitação e 450 nm para emissão. Os resultados foram expressos como Unidade Relativa de Fluorescência (URF).

2.4.4. Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Buege e Aust, 1978). O homogeneizado (5 mg de proteína) foi colocado em tubos de ensaio e adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato desódio (SDS) (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (solução aquosa a 0,67%). O volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura foi colocada em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Após o período de incubação, os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de n-butanol. Os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a absorvância foi medida a 535 nm. A concentração de lipoperoxidação foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

2.4.5 Avaliação do peso inicial e da longevidade das abelhas

Dos mesmos quadros dos quais foram obtidas abelhas para a realização dos testes de metabolismo oxidativo, foram obtidos outros indivíduos para a avaliação do peso inicial e longevidade. Para determinar o peso inicial de abelhas recém emergidas, 100 indivíduos de cada grupo de manejo alimentar foram mortos a frio, em freezer. Em seguida, amostras com 10 abelhas foram colocadas em cadinhos, que foram levados para secagem em estufa com circulação de ar a 105°C, por 16 horas (AOAC, 1990).

Para o teste de longevidade, foram utilizadas 480 abelhas, sendo metade de cada grupo de colônias com o mesmo manejo nutricional (S ou R). Grupos de 20 indivíduos recém nascidos foram colocados em gaiolas plásticas, recebendo as

mesmas dietas experimentais (2 manejos alimentares das colônias, 2 dietas das abelhas recém emergidas, 6 repetições). Foi registrado o número de abelhas mortas diariamente até a morte da última abelha e as quantidades de alimentos consumidos. As gaiolas foram mantidas em incubadora a 33°C e umidade relativa do ar igual a 70%.

2.5. Análises estatísticas

Foi calculada a quantidade semanal de pólen apícola coletada das colônias do grupo R. A eficiência dos coletores de pólen foi determinada a partir de duas observações para cada colônia. A dispersão dos dados foi determinada pelo erro padrão da média.

Para a análise dos dados de cada uma das variáveis do metabolismo oxidativo e consumo de alimento, foi empregado um planejamento fatorial de dois fatores. Este delineamento envolveu os fatores: manejo nutricional das colônias (suplementada - S ou restrita - R) e contaminação da dieta proteica das abelhas adultas (com fungicida - CF ou sem fungicida - SF). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, nos casos em que foi observado efeito significativo ($P < 0,05$), foram feitas comparações de médias pareadas por meio do teste de Tukey. O mesmo procedimento foi adotado para a avaliação do peso das abelhas, exceto por não se considerar o fator inerente à contaminação com fungicida, uma vez que as pesagens foram feitas tão logo as abelhas emergiram das células.

Para a avaliação da longevidade das abelhas, foi utilizado o método não paramétrico de Kaplan Meier.

2.6. Resultados

2.6.1. Manejo alimentar e coleta de pólen

Durante as 24 semanas de manejo alimentar das colônias, foi recolhido pólen apícola das colônias do grupo com restrição alimentar (R) diariamente (Figura 6). Em média, por colônia, foram obtidos $65,23 \pm 12,35$ g de pólen apícola, semanalmente. No período experimental, foram recolhidos de 1.171,27 a 1.828,42g de pólen apícola por colônia (R). No outro grupo, de colônias suplementadas semanalmente (S), foram fornecidos 2.400g de pasta proteica, contendo 1.800g de pólen apícola.

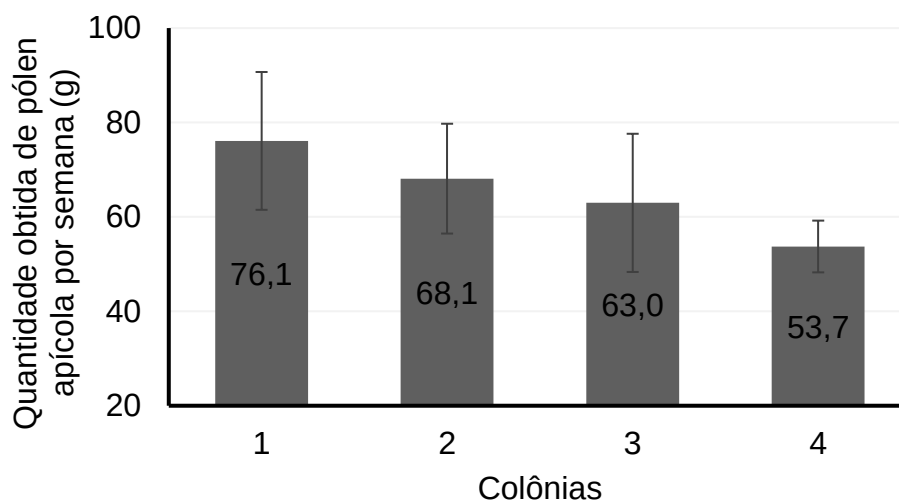


Figura 6. Quantidade semanal de pólen apícola coletado de quatro colmeias, do grupo com restrição alimentar (R), durante 24 semanas (média $\pm$ erro padrão da média).

2.6.2. Eficiência dos coletores de pólen

A eficiência média dos coletores de pólen foi de $61,2 \pm 4,8\%$. Dessa forma, considerando a quantidade recolhida de pólen apícola por meio dos coletores, a quantidade estimada desse alimento proteico que pode ter sido levado para dentro das colônias durante as 24 semanas foi de 454,80 a 709,98g. Por semana, a quantidade disponível de pólen apícola para cada colônia do grupo R foi de 18,95 a 29,58g.

2.6.3. Consumo de alimento proteico e metabolismo oxidativo

O consumo de pasta proteica pelas abelhas foi influenciado pela interação entre os fatores manejo alimentar das colônias das quais as abelhas foram obtidas e uso do fungicida (Tabela 1). Abelhas oriundas de colônias com alimentação suplementada, que receberam pasta proteica contendo pólen de girassol de inflorescências não tratadas com fungicida consumiram maior quantidade de alimento em comparação com as abelhas oriundas de colônias com alimentação restrita que receberam o mesmo alimento (SF). Essas abelhas (R-SF) consumiram mais alimentos que as demais (S-CF e R-CF), que não diferiram entre si. As abelhas oriundas de colônias suplementadas consumiram mais alimento que abelhas

oriundas de colônias com alimentação restrita. A contaminação do alimento com o fungicida implicou em redução do alimento, tanto para abelhas de colônias com manejo alimentar que visou favorecer o seu desenvolvimento, como para aquelas que tiveram menor quantidade de alimento disponível.

2.6.4. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi influenciada pelo manejo alimentar (Tabela 1), sendo maior em abelhas que tiveram maior quantidade de alimento disponível para o seu desenvolvimento durante a fase de cria, e pela contaminação do alimento das nutrízes com fungicida, com redução da atividade desta enzima quando as abelhas consumiram alimento contaminado.

2.6.5. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi influenciada pela interação dos fatores estudados, com redução de sua atividade em abelhas oriundas do grupo S que receberam alimento não contaminado nos primeiros dias da fase adulta em comparação às abelhas dos demais tratamentos, que não diferiram entre si (Tabela 1). A restrição alimentar das abelhas na fase de cria e a alimentação com alimento oriundo de inflorescências não tratadas com fungicida favoreceram a atividade da catalase.

2.6.6. Concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A concentração de glutathione reduzida foi maior em abelhas obtidas de colônias com manejo alimentar que restringiu a entrada de pólen apícola nas colmeias (Tabela 1). Não foi observado efeito do fungicida para este tripeptídeo. Para a glutathione oxidada, foi observada interação entre os fatores estudados, com maiores concentrações de GSSG quando as abelhas, oriundas de colônias com alimentação restrita, foram alimentadas nos primeiros cinco dias de vida com alimento não contaminado. Os demais tratamentos não diferiram entre si. Entretanto, não foi observada diferença na razão entre concentração de GSH e GSSG para as abelhas dos quatro tratamentos, indicando que não houve alteração do estado oxidativo da glutathione.

2.6.7. Estado oxidativo nos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A concentração de NAD(P)H no homogenato do tórax foi maior em abelhas oriundas de colônias que tiveram sua alimentação suplementada (Tabela 1). Não foi observado efeito do fungicida estudado.

2.6.8. Avaliação da lipoperoxidação

Por meio da análise da peroxidação lipídica por meio do bioindicador MDA (malondialdeído), observou-se que o consumo de alimento contaminado com fungicida implicou em aumento dos níveis de lipoperoxidação (Tabela 1). A alimentação das colônias nas quais as abelhas se desenvolveram na fase de cria não interferiu na lipoperoxidação.

Tabela 1. Consumo médio de pasta proteica por cinco dias, por abelha, atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no homogeneizado do tórax das abelhas após o período de alimentação.

Efeitos		Consumo	GPx	CAT	GSH	GSSG	GSH/GSSG	NAD(P)H	MDA
Alimentação	Suplementada (S)	10,973	127,570 A	24,065	1,453 B	0,067	22,145	23,873 A	0,197
	Restrita (R)	7,968	92,725 B	30,785	2,477 A	0,110	24,440	7,630 B	0,188
Fungicida	Com (CF)	6,716	104,400 b	23,705	1,928	0,077	25,385	15,750	0,200 a
	Sem (SF)	12,223	115,890 a	31,145	2,002	0,100	21,200	15,758	0,185 b
Interação	S x CF	6,823 C	126,800	18,523 B	2,520	0,070 B	20,973	23,870	0,210
	S x SF	15,122 A	128,330	29,607 A	1,483	0,063 B	23,317	23,877	0,183
	R x CF	6,608 C	103,440	28,887 A	2,433	0,083 B	29,797	7,630	0,190
	R x SF	9,325 B	82,009	32,683 A	2,520	0,137 A	19,083	7,640	0,187
Erro padrão médio		0,989	6,025	1,671	0,174	0,010	1,912	2,448	0,004
Fonte de variação		Probabilidade							
Alimentação (a)		<0,0001	0,0001	0,0002	0,0006	0,0047	>0,2000	<0,0001	>0,2000
Fungicida (b)		0,0005	0,0302	0,0001	>0,2000	0,0703	>0,2000	>0,2000	0,0428
Interação (a x b)		0,0008	0,0522	0,0090	>0,2000	0,0278	0,0954	>0,2000	0,0983

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula para o mesmo efeito (alimentação das abelhas ou uso de fungicida em plantas de girassol ou interação entre esses fatores) para cada variável estudada não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Consumo de alimento das abelhas: mg/abelha, por cinco dias; GPx: mU/mg de proteína; CAT: $\mu\text{mol/mg}$ de proteína/min; GSH, GSSG e MDA: nmol/mg de proteína; NAD(P)H: Unidade Relativa de Fluorescência.

Alimento constituído de três partes de pólen de girassol tratado ou não com o fungicida Fox Xpro e uma parte de mel.

2.6.9. Peso inicial e longevidade das abelhas

A matéria original das abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar não foi diferente daquela observada para abelhas oriundas de colônias com alimentação restrita (Tabela 2). Após a secagem das amostras, o teor de matéria seca e a relação matéria seca: matéria original foram maiores com abelhas oriundas de colônias S em comparação às abelhas do grupo R.

Tabela 2. Média da matéria original (MO), matéria seca (MS) e relação MS:MO de abelhas recém emergidas obtidas de colônias com alimentação suplementada (S) ou restrita (R).

Efeitos		Matéria original (MO)	Matéria seca (MS)	MS:MO
Alimentação	Suplementada (S)	82,72	18,06 A	21,83 A
	Restrita (R)	79,37	15,53 B	19,57 B
Erro padrão médio		1,21	0,54	0,46
Valor de P		0,1784	0,0074	0,0044

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. MO e MS: mg; relação MS:MO: %. Médias obtidas a partir de 10 indivíduos.

A sobrevida das abelhas foi alterada em função dos tratamentos ($X^2 = 7,815$, $p < 0,0001$) (Figura 7). A sobrevida das abelhas que, na fase de cria se desenvolveram em colônias suplementadas e que na fase adulta receberam alimento não contaminado com fungicida ($15,20 \pm 0,34$ dias), foi maior que das abelhas oriundas das mesmas colônias e que receberam alimento contaminado com fungicida na fase adulta ($12,88 \pm 0,33$ dias) e que se desenvolveram em colônias com alimentação restrita e que na fase adulta receberam alimento contaminado ($12,08 \pm 0,27$) ou não ($13,04 \pm 0,36$ dias), os quais não diferiram entre si. Não foi observado efeito sinérgico entre restrição alimentar da colônias e contaminação do alimento das abelhas adultas com fungicida.

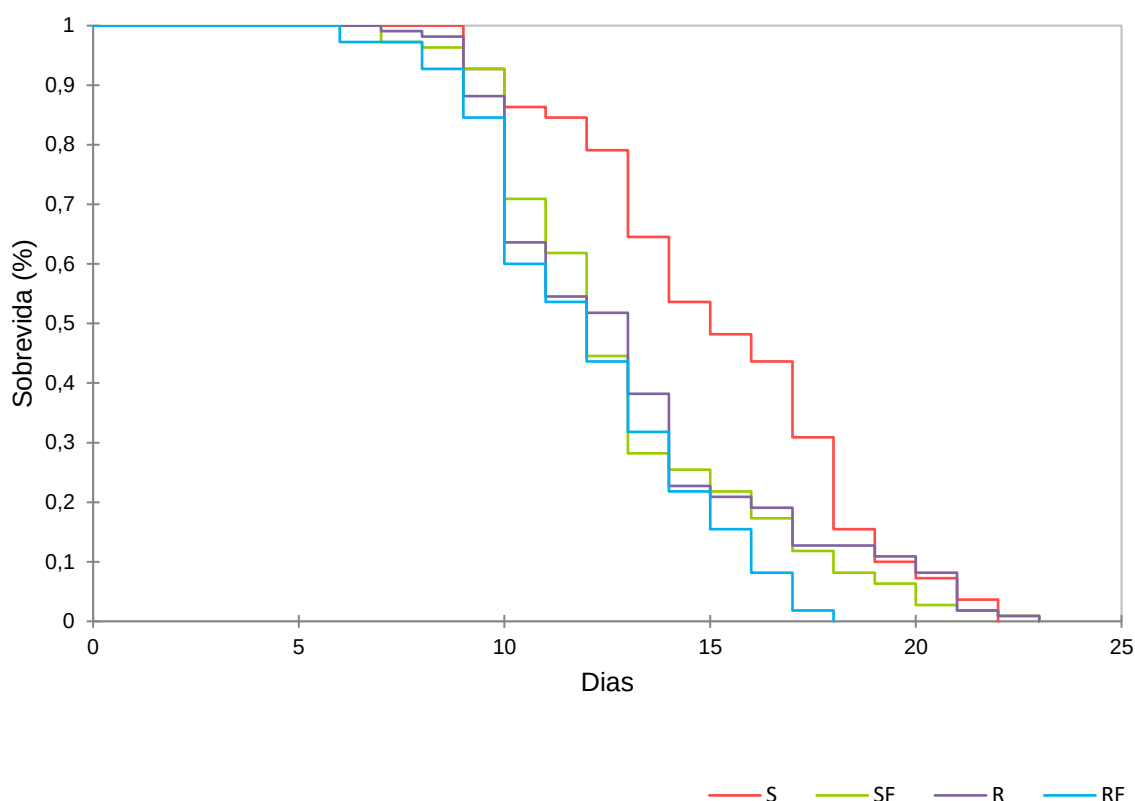


Figura 7. Gráfico de Kaplan Meier da longevidade de abelhas que na fase de cria se desenvolveram em colônias com suplementação (S) ou restrição (R) alimentar e que na fase adulta receberam alimento proteico contaminado (RF) ou não (SF) com fungicida.

3. Discussão

A eficiência na coleta de recursos está intrinsecamente ligada à condição de saúde da colônia, uma vez que o ato de coletar pólen pelas operárias é condicionado pela demanda de suprimento proteico para o desenvolvimento das abelhas (DeGrandi-Hoffman et al., 2018; Gray et al., 2019). O pólen desempenha um papel fundamental na alimentação da colônia, principalmente quando as abelhas iniciam a produção de alimento para as crias e para a rainha (Crailsheim, 1992).

A coleta diária de pólen por meio dos coletores de pólen e os dados de eficiência dos coletores em restringir a entrada de pólen nas colônias, ao longo das 24 semanas, indica que as colônias que enfrentaram restrição alimentar (R) mantiveram seu comportamento ativo de coleta de pólen. Isto demonstra a capacidade das abelhas em buscar fontes de alimento, mesmo quando expostas a condições adversas. Tal resiliência é fundamental para a sobrevivência das

colônias em ambientes com recursos escassos, por algumas semanas ou meses. Contudo, a variação individual na coleta de pólen revelou uma diversidade no comportamento de forrageamento entre as colmeias. De acordo com Corona et al. (2023), o estresse nutricional contribui significativamente para o enfraquecimento e perda das colônias, isso está intrinsecamente atrelado com a saúde e vigor da colônia, degradação do habitat, diversidade polínica e diferenças inatas de forrageamento entre abelhas de diferentes colônias. A privação de pólen induz as abelhas ao forrageamento precoce, que por sua vez está associado ao envelhecimento acelerado e à redução da longevidade destes insetos (Perry et al., 2015; Corona et al., 2023).

A eficiência média dos coletores de pólen foi equivalente ao observado por Reis (2000) e Milfort (2020), sugerindo que um bom coletor deve ter a eficiência de 59 a 70%, tendo variações de eficiência conforme a granulometria do pólen colhido. Com restrição alimentar, as colônias passam por um ajuste populacional para equilibrar demanda e oferta de pólen. A quantidade estimada de alimento que as abelhas conseguiram levar para dentro dos ninhos é compatível com a quantidade mínima necessária para manter cerca de 4 mil indivíduos, considerada uma pequena colônia de abelhas melíferas (Danner et al., 2017).

O pólen apícola é uma fonte rica em nutrientes, composto por proteínas, aminoácidos livres, lipídios, ácidos graxos, açúcares, fibras, vitaminas, minerais. Além de todos estes constituintes, pólen apícola contém fitoquímicos, que lhe confere notável atividade antioxidante (Kieliszek et al., 2018; Aylanc et al., 2021). Dessa forma, o pólen apícola é útil como fonte de antioxidantes que protegem as células contra danos à estrutura oxidativa do citoplasma, no interior das organelas celulares e no líquido extracelular (Martinello e Mutinelli, 2021). O pólen de diferentes origens botânicas possui diferentes capacidades antioxidantes, o que está mais relacionado aos perfis específicos de flavonas e ácidos fenólicos (Borycka et al., 2015), evidenciando a importância da nutrição proteica em aspectos fisiológicos das abelhas (Wright et al., 2018).

Segundo Couto e Couto (2006), estima-se que para o desenvolvimento de cada abelha sejam utilizados 120 mg de pólen. Até atingirem a idade de atuarem como abelhas nutrizas, o consumo proteico é alto para que as glândulas hipofaríngeas possam se desenvolver completamente. Isso foi evidenciado

pelo maior consumo médio de abelhas em estudos feitos durante o período inicial de desenvolvimento de abelhas (Cremonez et al., 1998), em contraste com experimentos de períodos mais extensos, como observado por Pernal e Currie (2001). No presente estudo, no que diz respeito ao consumo de alimento proteico com pólen de girassol, as abelhas recém emergidas, oriundas do grupo S-SF, consumiram cerca de 2,27 mg de pólen de girassol por dia, durante os cinco primeiros dias de vida. Crailsheim et al. (1992), observaram que abelhas nutrízes consumiram em média 3,9 mg/abelha de pólen por dia, durante a fase de nutrízes, época de maior consumo.

Abelhas oriundas de colônias submetidas a restrição alimentar consumiram menos alimento, que aquelas que na fase de cria se desenvolveram em ambiente com maior disponibilidade de alimento, considerando-se pólen de girassol não tratado com fungicida. Dessa forma, considera-se que a restrição alimentar na fase de cria prejudica o desenvolvimento da abelha na fase adulta, não observando-se um ganho compensatório no consumo de alimento na fase adulta para compensar a restrição da fase de cria. Larvas criadas durante a deficiência de um nutriente essencial podem se tornar em adultos com menor sobrevivência ou com habilidades de cuidado da cria e forrageamento prejudicadas (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

No que diz respeito a contaminação do alimento, abelhas oriundas de colônias dos dois manejos alimentares tiveram consumo reduzido de pasta proteica. A sensibilidade das abelhas aos agrotóxicos pode estar atrelada a sua idade, com aumento da suscetibilidade à medida que as abelhas envelhecem (Zhu et al., 2020). Robinson (2002), sugere que isso pode estar relacionado às mudanças na atividade endócrina e metabólica que ocorrem durante a maturação comportamental relacionada à idade, inerentes à transição de tarefas de nutrízes para forrageiras. As abelhas campeiras apresentam maior atividade enzimática detoxificante que abelhas que trabalham apenas dentro da colônia (Smirle e Robinson, 1989; Berenbaum e Johnson, 2015). Esses resultados reforçam a ideia de que abelhas nutrízes são mais suscetíveis ao estresse oxidativo em comparação com abelhas forrageiras.

O pólen de girassol foi apontado em alguns estudos como sendo de qualidade nutricional inferior a vários outros tipos de pólen (Schmidt et al., 1987), de baixo teor proteico (Radev, 2019) e com níveis de dois aminoácidos essenciais às

abelhas melíferas abaixo do mínimo exigido pelas abelhas (Nicolson e Human, 2013). Podendo ser o causador do aumento do consumo de alimento proteico. Embora originário de uma única espécie vegetal, o pólen possui uma complexa composição química, abrangendo aminoácidos, lipídios, açúcares, metabólitos secundários e outros elementos (Palmer-Young et al., 2019). De fato, os compostos secundários das plantas têm se destacado por seus potenciais impactos positivos sobre os polinizadores, incluindo ação protetora contra exposição a agrotóxicos (Ardalani et al., 2021). No entanto, a coleta de alimento em plantas de várias culturas favorece a obtenção de uma dieta mais equilibrada e rica em ingredientes (Vaudo et al., 2015).

A hipótese de que uma nutrição adequada pode proteger os animais contra os efeitos adversos de estressores, como agrotóxicos, é uma perspectiva consolidada na biologia (Wahl e Ulm, 1983). Nesse estudo, os resultados destacam claramente o papel central da nutrição na regulação das atividades enzimáticas, particularmente relacionado à enzima GPx. Uma dieta enriquecida parece não somente satisfazer as demandas básicas das abelhas, mas também potencializar seus mecanismos bioquímicos intrínsecos, como evidenciado pelo aumento da atividade da GPx. Abelhas oriundas de colmeias suplementadas demonstraram uma performance enzimática significativamente superior em relação àquelas com dieta restrita. Tal constatação reitera a relevância de uma nutrição balanceada para o desempenho otimizado dessa enzima específica. Estudos adicionais corroboram com esses resultados, indicando que abelhas com dieta adequada processam agrotóxicos de maneira mais eficiente após a ingestão de pólen (Ardalani et al., 2021).

A influência do fungicida sobre as atividades enzimáticas apresenta-se de forma conclusiva. Embora as abelhas suplementadas e expostas ao fungicida (S-CF) não tenham revelado diferenças marcantes em relação às não expostas, foi identificada uma diminuição sutil na atividade enzimática dessas abelhas em contato com a substância. Sugere-se que essa redução pode ser atribuída ao fungicida protriocanazol, pertencente ao grupo químico dos triazóis, que inibe a síntese de ergosterol em fungos por meio do citocromo P450. Um efeito inibitório similar foi detectado nas monoxigenases do citocromo P450 (P450) de abelhas melíferas, afetando sua via de desintoxicação, conforme relatado por Schuhmann

et al. (2022). Os efeitos observados estão de acordo com os descritos por Chakrabarti et al. (2015). Segundo esses autores, um elevado nível de atividade enzimática antioxidante é indicador crucial para abelhas em ambientes com contaminação por agrotóxicos. Isso indica um potencial efeito nocivo do fungicida sobre a atividade da GPx.

A atividade da enzima GPx teve um aumento discreto em abelhas suplementadas e não expostas a fungicidas (S-SF). De acordo com Wahl e Ulm (1983), a sensibilidade ao estresse oxidativo em abelhas é reduzida com uma dieta rica em pólen de alta qualidade, mas se intensifica quando alimentadas com pólen de qualidade inferior ou substitutos de pólen. Esse resultado pode estar relacionado à qualidade proteica do pólen de girassol utilizado nesse estudo.

Os sistemas de defesa antioxidante em abelhas melíferas abrangem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, ambos fundamentais para mitigar os danos ocasionados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (Corona et al., 2023). Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Paralelamente, os componentes não enzimáticos, como glutathione, NAD(P)H e vitaminas C e E, participam ativamente na neutralização de ERO (Badiou-bénéteau et al., 2012; Tawfik et al., 2020).

A combinação de restrição nutricional e ausência de fungicida (R-SF) potencializou a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH e GSSG no tórax das abelhas, sinalizando uma tendência pró-oxidante. Esses dados apontam que a restrição alimentar pode desencadear estresse oxidativo. Entretanto, a dieta baseada exclusivamente em pólen de girassol pode ter resultado em um fortalecimento da defesa antioxidante. Já nas abelhas provenientes de colmeias suplementadas, que foram alimentadas com pólen tratado (SxCF), observou-se uma redução significativa na atividade enzimática de CAT. Esse declínio sugere que a defesa antioxidante não conseguiu neutralizar os níveis de ERO gerados pela exposição ao fungicida, possivelmente levando a danos oxidativos.

A relação GSH/GSSG é reconhecida como indicador fundamental do equilíbrio redox intracelular e da capacidade antioxidante. Nesse estudo, essa relação indicou que as abelhas submetidas a restrição e alimentadas com pólen de girassol tratado (R-CF) apresentaram elevada atividade enzimática, o que sugere

um aumento compensatório na atividade antioxidante. Por outro lado, a concentração de NAD(P)H se mostrou mais expressiva nas abelhas que receberam suplementação (S), sem que o fungicida, na dosagem utilizada exercesse impacto significativo. Esses dados corroboram ao estudo de Mattos et al. (2017), que identificaram que a oferta de pólen pode mitigar os efeitos da exposição a agrotóxicos.

Um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica, evidenciado pelo marcador MDA, foi observado em amostras de abelhas alimentadas com pólen oriundo de inflorescências tratadas com fungicida, independente da colônia de origem das abelhas. A lipoperoxidação é reconhecida como um sinal de lesão celular e estresse oxidativo. Esse padrão sugere que a interação de suplementação alimentar com a exposição ao fungicida pode comprometer a saúde das abelhas.

O peso inicial das abelhas pode ser influenciado pela suplementação alimentar, tanto com carboidratos como com ingredientes proteicos, resultando em efeitos positivos na saúde e longevidade e das abelhas adultas, desde que a dieta seja nutricionalmente equilibrada (Kaznowski et al., 2005; Ihle et al., 2014). No presente estudo, o peso inicial das abelhas foi favorecido pelas condições nutricionais mais favoráveis nas colônias com suplementação alimentar. Quanto a longevidade, observa-se que a alimentação e a exposição a fungicidas afetam diretamente a longevidade das abelhas.

Abelhas que na fase de cria se desenvolveram em colônias suplementadas e que na fase adulta não receberam alimento contaminado viveram 16,6% a mais que abelhas que tiveram a alimentação restrita na fase de cria e receberam alimento não contaminado. Os maiores impactos na sobrevivência das abelhas foram observados quando os insetos receberam na fase adulta alimento contaminado com pólen, com redução igual ou maior a 18% da longevidade em comparação com as abelhas mais longevas (S-SF).

Os resultados presentes alinham-se com as observações de Di Pasquale et al. (2013), evidenciando que, a depender do estágio de desenvolvimento, a qualidade e a diversidade do alimento interferem na fisiologia, tolerância e sobrevivência das abelhas. Importante ressaltar que, embora tanto a restrição de alimento quanto a presença de fungicidas possam provocar diminuição da longevidade, não foi observado efeito sinérgico entre ambos. Além da nutrição e

exposição a agrotóxicos, a disponibilidade de água pode ser um fator importante para a sobrevivência das abelhas, considerando-se que esta substância pode ser útil em processos metabólicos ligados à imunidade e detoxificação destes insetos (Nearman e vanEngelsdorp, 2022).

4. Conclusão

A alimentação de abelhas com pólen contaminado pelo fungicida composto por bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina tem potencial de alterar, por si só, o metabolismo oxidativo e a sobrevivência das abelhas, sobretudo de abelhas nutrízes provenientes de colmeias com restrição alimentar.

Referências

Aebi H, B. H. U. 1974. Catalase. In: BERGMEYER, H. U. (ed). Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, p.673-684.

AOAC. Official Methods of Analysis. 15. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1298p, 1990.

ARDALANI, H.; VIDKJÆR, N. H.; KRYGER, P.; FIEHN, O.; FOMSGAARD, I. S. Metabolomics unveils the influence of dietary phytochemicals on residual pesticide concentrations in honey bees. **Environment International**, v. 152, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106503>>

AYLANC, V.; FALCÃO, S. I.; ERTOSUN, S.; VILAS-BOAS, M. From the hive to the table: nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. **Trends in Food Science & Technology**, v.109, p.464-481, 2021.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. P. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 82, p. 22–31, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005>>

BATISTA, A.C.; DOMINGUES, C.E.C.; COSTA, M.J.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Is astrobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**; v. 59, n. 5, pp.1-10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>>

BAYER. **Fox Xpro: Fungicida**. São Paulo (SP): Bayer S. A.; 2019. [Acesso em 24 Agosto 2023]. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protecaodecultivos/fox-xpro>>

BERENBAUM, M.R.; JOHNSON, R.M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Curr. Opin. Insect. Sci.**, v.10, p.51-58, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>>

BÖHME, F.; BISCHOFF, G.; ZEBITZ, C. P. W.; ROSENKRANZ, P.; WALLNER, K. Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticidemixture in realistic field exposure rates. **Apidologie**, 48, 353-363, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0479-x>>

BORYCKA, K.; GRABEK-LEJKO, D.; KASPRZYK, I. Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products. **J. Apic. Res.**, v. 54, n. 5, p. 491-502, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1185309>>

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52: 302-310

CAIN, K.; AND SKILLETER, D. N. 1987. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press. p. 217–254.

CARNEIRO, L.S.; MARTÍNEZ, L.C.; GONÇALVES, W.G.; SANTANA, L.M.; SERRÃO, J.E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target worker honey bees *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>>

CHAKRABARTI, P.; RANA, S.; SARKAR, S.; SMITH, B.; BASU, P. Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. **Apidologie**, v. 46, n. 1, p. 107- 129, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0308-z>>

CIZELJ, I.; GLAVAN, G.; BOŽIČ, J.; OVEN, I.; MRAK, V.; NARAT, M. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 68-75, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.015>>

CORONA, M.; BRANCHICCELA, B.; ALBURAKI, M.; PALMER-YOUNG, E.C.; MADELLA, S.; CHEN, Y.; EVANS, J.D. Decoupling the effects of nutrition, age, and behavioral caste on honey bee physiology, immunity, and colony health. **Front. Physiol.**, v.14, p.1149840, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1149840>>

COSTA, C. P.; LEZA, M.; DUENNES, M. A.; FISHER, K.; VOLLARO, A.; HUR, M.; KIRKWOOD, J. S.; WOODARD, S. H. Pollen diet mediates how pesticide exposure impacts brain gene expression in nest-founding bumble bee queens. **Science of The Total Environment**, v. 833, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155216>>

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal:FUNEP, 193 p, 2006.

CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, L.H.W.; HRASSNIGG, G.; BÜHLMANN, G.; BROSCH, U.; GMEINBAUER, R.; SCHÖFFMANN, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, 38 (6), 409-419, 1992.

CREMONEZ, T. M.; DE JONG, D.; BITONDI, M. M. G. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 1284-1288, 1998.

DANNER, N.; KELLER, A.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Honey bee foraging ecology: season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. **PLoS One**, v.12, n. 8, e0183716, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183716>>

DEGRANDI-HOFFMAN, G., GAGE, S. L., CORBY-HARRIS, V., CARROLL, M., CHAMBERS, M., GRAHAM, H., WATKINS DEJONG, E., HIDALGO, G., CALLE, S., AZZOUZ-OLDEN, F., MEADOR, C., SNYDER, L., & ZIOLKOWSKI, N. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology**, 109, 114–124, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>>

DE MATTOS, I. M.; SOARES, A. E. E.; TARPY, D. R. Mitigating effects of pollen during paraquat exposure on gene expression and pathogen prevalence in *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 32-44, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-017-1868-2>>

DI PASQUALE, G.; SALIGNON, M.; LE CONTE, Y.; BELZUNCES, L. P.; DECOURTYE, A.; KRETZSCHMAR, A.; SUCHAIL, S.; BRUNET, J.; ALAUX, C. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e7, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>>

FISHER, A.; CARVALHO, C. U.; OLIVEIRA, C.; RIBEIRO, B.; OLIVEIRA, J.; RANGEL, E. Synergistic effects of almond protective fungicides on the survival of bee foragers (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 110, 2017, pp. 802-808. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/tox031>>

FISHER, A.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; LIAO, L.-H.; TADEI, R.; HARRISON, J. F. The challenge of balancing fungicide use and pollinator health, **Advances in Insect Physiology**, Academic Press, v.64, 2023, p.117-190. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2023.01.002>>

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, 105: 114-121.

GRAY, A.; BRODSCHNEIDER, R.; ADJLANE, N.; BALLIS, A.; BRUSBARDIS, V.; CHARRÈRE, J. D.; CHLEBO, R.; COFFEY, M. F.; CORNELISSEN, B.; AMARO DA COSTA, C.; CSÁKI, T.; DAHLE, B.; DANIHLÍK, J.; DRAŽIĆ, M. M.; EVANS, G.; FEDORIAK, M.; FORSYTHE, I.; DE GRAAF, D.; GREGORC, A.; SOROKER, V. Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. **Journal of Apicultural Research**, v.58, n.4, p. 479–477, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661>>

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, p. 143-156, 1970.

HERNÁNDEZ, J., RIVEROS, A.J., AMAYA-MÁRQUEZ, M. Sublethal doses of glyphosate impair olfactory memory retention, but not learning in the honey bee (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of Insect Conservation**, 25, 683–694, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10841-021-00335-6>>

HISSIN, P. J.; HILF, R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 74: 214-226.

HOSKINS, D. D.; CHELDELIN, V.H.; NEWBURGH, R.W. 1956. Oxidation enzyme systems of the honey bee, *Apis mellifera* L. **Journal of General Physiology**, 39: 705–713.

IHLE, K. E.; BAKER, N. A.; AMDAM, G. V. Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. **Journal of Insect Physiology**, v.69, p. 49-55, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.026>>

KAZNOWSKI, A.; SZYMAS, B.; JAZDZINSKA, E.; KAZIMIERCZAK, M.; PAETZ, H.; MOKRACKA, J. The effects of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*), **Journal of Apicultural Research**, 4:1, p. 10-14, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101139>>

KIELISZEK, M.; PIWOWAREK, K.; KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL, A.; WOLSKA, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 170-180, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>>

KLEIN, A. M., B. E. VAISSIÈRE, J. H. CANE, I. STEFFAN- DEWENTER, S. A. CUNNINGHAM, C. KREMEN, AND T. TSCHARNTKE. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, v.274: 303–313, 2007.

LIAO, L.H.; WU, W.Y.; BERENBAUM, M.R. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15924, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15066-5>>

MAO, W.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 10, p. 2538-2543, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>>

MARTINELLO, M.; MUTINELLI, F. Antioxidant Activity in Bee Products: **A Review. Antioxidants**, v. 10, n. 71, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox10010071>>

MILFONT, M. O. Diversificando a produção na apicultura: pólen apícola. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2020.

NEARMAN, A.; vanENGELSDORP, D. Water provisioning increases caged worker bee lifespan and caged worker bees are living half as long as observed 50 years ago. **Scientific Reports**, v. 12:18660, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21401-2>>

NICOLSON, S.W., HUMAN, H. Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). **Apidologie** v. 44, p. 44–152, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-012-0166-5>>

PALMER-YOUNG, E. C.; FARRELL, I. W.; ADLER, L. S.; MILANO, N. J.; EGAN, P. A.; IRWIN, R. E.; STEVENSON, P. C. Secondary metabolites from nectar and pollen: a resource for ecological and evolutionary studies. **Ecology**, v. 100, n. 4, e02621, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ecy.2621>>

PERNAL, S.P.; CURRIE, R.W. The influence of pollen quality on foraging behaviour in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 51, n. 1, p.53-68, 2001.

PERRY, C.; SØVIK, E.; MYERSCOUGH, M. R.; BARRON, A. B. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 112, p. 3427–3432, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1422089112>>

POQUET, Y., VIDAÜ, C., ALAUX, C. Modulation of pesticide response in honeybees. **Apidologie** 47, 412–426, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0429-7>>

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, 540, 220–229, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature20588>>

PRADO, A., PIOZ, M., VIDAÜ, C., REQUIER, F., JURY, M., CRAUSER, D., BRUNET, J.-L., LE CONTE, Y., ALAUX, C. Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of The Total Environment**. 650, 1250–1260, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.102>>

QUINLAN, G. M.; GROZINGER, C. M., Chapter Five - Honey bee nutritional ecology: From physiology to landscapes, **Advances in Insect Physiology**, Academic Press, v.64, 2023, p. 289-345. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2023.01.003>>

RADEV, Z. Pollen protein content from different regions in Bulgaria suggests low variability. **Bee World**, v. 96, n. 4, p. 108–110, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/0005772X.2019.1654593>>

RAIJ, B. V.; CANTERELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 1997. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2 ed. Campinas: **Instituto Agrônomo**. 285p.

REIS, V. D. A. Fatores que influenciam na coleta de pólen por *Apis melífera* L. e análises físico-químicas do pólen coletado. 2000. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – **ESALQ/USP**, Piracicaba, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-20191218-170308>>

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBINSON, G. E. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. **Am. Nat.**, v. 160, p. S160-S172, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/342901>>

RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>>

SCHMIDT, J. O.; THOENES, S. C.; LEVIN, M. D. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. **Journal of Economic Entomology** v. 80, p. 176–183, 1987.

SCHUHMANN, A.; SCHMID, A. P.; MANZER, S.; SCHULTE, J.; SCHEINER, R. Interaction of insecticides and fungicides in bees. **Frontiers in Insect Science**, v. 1, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>>

SMIRLE, M.J.; ROBINSON, G.E. Behavioral status and detoxifying enzyme activity are related in worker honey bees. **Journal of Insect Behavior**, v. 2, p. 285-289, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01053300>>

TADEI, R., DOMINGUES, C. E. C., MALAQUIAS, J. B., CAMILO, E. V., MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E. C. M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, 9(1), 3277, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>

TAWFIK, A. I.; AHMED, Z. H.; ABDEL-RAHMAN, M. F.; MOUSTAFA, A. M. Influence of winter feeding on colony development and the antioxidant system of the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1752456>>

TONG, L., NIEH, J.C., TOSI, S. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, 237, 124408, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124408>>

VAUDO, A.D.; TOOKER, J.F.; GROZINGER, C.M.; PATCH, H.M. Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 133-141, 2015.

WAHL, O.; ULM, K. Influence pollen feeding and physiological condition on pesticidesensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. **Oecologia**, v. 59, p. 106–128, 1983.

WICKRAMASINGHE, K., MATHERS, J. C., WOPEREIS, S., MARSMAN, D.S., GRIFFITHS, J.C. From lifespan to healthspan: The role of nutrition in healthy ageing. **Journal of Nutritional Science**, 9, e33, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/jns.2020.26>>

WRIGHT, G.A.; NICOLSON, S.W.; SHAFIR, S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 327-344, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>>

ZHU, Y. C.; CAREN, J.; REDDY, G. V. P.; LI, W.; YAO, J. Effect of age on insecticide susceptibility and enzymatic activities of three detoxification enzymes and one invertase in honey bee workers (*Apis mellifera*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 238, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108844>>