

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA NUTRIÇÃO E DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE
ASPECTOS BIOLÓGICOS EM ABELHAS MELÍFERAS
EXPOSTAS AO FUNGICIDA FOX XPRO**

Yara Martins Molina Ferraz
Zootecnista

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA NUTRIÇÃO E DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE
ASPECTOS BIOLÓGICOS EM ABELHAS MELÍFERAS
EXPOSTAS AO FUNGICIDA FOX XPRO**

**Yara Martins Molina Ferraz
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 Ciência Animal.

F381e	Ferraz, Yara Martins Molina Efeito da nutrição e da própolis verde sobre aspectos biológicos em abelhas melíferas expostas as fungicida Fox Xpro / Yara Martins Molina Ferraz. -- Jaboticabal, 2024 112 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Daniel Nicodemo 1. Apicultura. 2. Nutrição. 3. Fungicida. 4. Própolis Verde. 5. Expressão de Genes. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA NUTRIÇÃO E DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS EM ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS AO FUNGICIDA FOX XPRO

AUTORA: YARA MARTINS MOLINA FERRAZ

ORIENTADOR: DANIEL NICODEMO

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

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

Prof. Dr. GUSTAVO DO VALLE POLYCARPO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT UNESP Dracena



Documento assinado digitalmente
GUSTAVO DO VALLE POLYCARPO
Data: 14/06/2024 11:22:29-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. RODRIGO ZALUSKI (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Florianópolis/SC



Documento assinado digitalmente
RODRIGO ZALUSKI
Data: 13/06/2024 12:36:47-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Jaboticabal, 12 de junho de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Yara Martins Molina Ferraz – Nascida em 20 de janeiro de 1998, em Campinas – São Paulo. Graduada em Zootecnia pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP, Campus de Botucatu, em 2021. No ano subsequente, ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Campus de Jaboticabal, na área de Nutrição Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Nicodemo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Carmen Silvia de Oliveira Martins Ferraz e Pedro Sergio Molina Ferraz, que estiveram sempre ao meu lado, zelando por mim e me dando todo o apoio em todos os momentos durante esta jornada que foi o mestrado; Ao meu orientador, Prof.^o Dr.^o Daniel Nicodemo, por ter me aceitado como orientada e por ter tido toda a paciência do mundo para me guiar durante todo o processo e sempre ter sido disponível para me auxiliar e incentivar em todos os momentos de dificuldade. Agradeço profundamente pelo apoio inestimável e por compartilhar seu vasto conhecimento comigo;

A Prof.^a Dr.^a Jaqueline Dalbello Biller, por ter disponibilizado seu tempo e conhecimento para me orientar e auxiliar durante minhas análises laboratoriais;

Aos meus colegas do grupo NOS - Núcleo de Organização Sustentável, que passaram por todas as etapas do mestrado junto comigo, me ajudando em momentos de dificuldade, me ensinado sobre a importância do trabalho em equipe e agregando conhecimento durante todo o meu percurso do mestrado;

Aos meus amigos, que estão ao meu lado desde o ensino médio, há mais de dez anos, sempre me ouvindo, encorajando e dando suporte nos momentos em que quis desistir, proporcionando momentos maravilhosos que pretendo levar pelo resto da vida;

Aos amigos que fiz durante a graduação e pós-graduação, que passaram por essas jornadas junto comigo, compartilhando momentos de alegria e dificuldade, e juntos superamos problemas que achávamos insuperáveis;

Agradeço à FCAV - Unesp Jaboticabal pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal, que me aceitou e permitiu meu desenvolvimento como mestranda, também a FCAT - Unesp Dracena, que proporcionou um ótimo ambiente e estrutura, para a realização de todas as etapas do meu experimento;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

Capítulo 1 – Considerações Gerais	11
1.1 Introdução	11
1.2 Biologia social das abelhas.....	13
1.3 Nutrição das abelhas	19
1.4 Saúde das abelhas	25
1.5 Declínio populacional mundial das abelhas	33
1.6 Impacto dos fungicidas nas abelhas	37
1.6.1 Bixafem	41
1.6.2 Trifloxistrobina	42
1.6.3 Protioconazol.....	42
2. Objetivo	43
Referências	44
2. CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL E COM PRÓPOLIS PROMOVE AUMENTO DA LONGEVIDADE DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS À FUNGICIDA DE TRIPLA AÇÃO, SEM MITIGAR OS PREJUÍZOS OBSERVADOS NA EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS À SAÚDE.....	64
2.1 Introdução	66
2.2 Materiais e Métodos	68
2.1 Local do experimento	68
2.2 Colônias de abelhas melíferas e manejo alimentar	69
2.3 Cultivo de girassol, tratamento com fungicida e obtenção de pólen	70
2.4 Determinação da concentração de própolis na alimentação energética	73
2.5 Obtenção de abelhas recém emergidas	75
2.6 Avaliação do peso das abelhas recém emergidas	76
2.7 Alimentação das abelhas contendo extrato aquoso de própolis e pólen de girassol em gaiolas	77
2.8 Avaliação da longevidade das abelhas	78
2.9 Quantificação de proteínas na hemolinfa das abelhas	78
2.10 Extração de RNA e construção de biblioteca de cDNA	80

2.11 Determinação molecular da expressão de genes.....	83
2.12 Análises estatísticas	84
2.13 Resultados	85
2.13.1 Manejo alimentar e quantidade obtida de pólen nas colônias submetidas à restrição alimentar	85
2.13.2 Eficiência dos coletores de pólen.....	86
2.13.3 Peso vivo e peso seco de abelhas recém-emergidas	86
2.13.4 Consumo de pasta proteica durante o período que antecedeu a coleta dos abdomens	87
2.13.5 Consumo de xarope durante o período que antecedeu a coleta dos abdomens	88
2.13.6 Teor de proteína na hemolinfa	88
2.13.7 Expressão dos genes de imunidade, estresse oxidativo e detoxificação	89
2.13.8 Longevidade das abelhas alimentados com pólen com ou sem fungicida e xarope com ou sem própolis.....	94
3. Discussão	95
3.1 Manejo alimentar das colmeias.....	95
3.2 Peso ao emergir das abelhas	96
3.3 Consumo de pasta proteica e xarope com própolis	97
3.4 Avaliação dos níveis de proteína na hemolinfa.....	99
3.5 Expressão de genes do sistema imunológico, metabolismo oxidante e detoxificação	100
3.6 Longevidade das abelhas.....	103
4. Conclusão	104
Referências	104

EFEITO DA NUTRIÇÃO E DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS EM ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS AO FUNGICIDA FOX XPRO

RESUMO

O uso descontrolado de agrotóxicos tem causado uma perda significativa de abelhas, tanto as que se encontram na natureza quanto as manejadas em apiários. Isso tem levado à diminuição da produção das abelhas e à contaminação de seus produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da expressão gênica, se a suplementação nutricional acrescida ou não de própolis pode mitigar os malefícios à saúde das abelhas expostas a um fungicida de ação tripla. Durante 22 semanas, cinco colônias tiveram a alimentação suplementada com pasta proteica e xarope energético enquanto outras cinco colônias não receberam suplementação alimentare tiveram acesso restrito ao pólen. Após esse período, abelhas recém emergidas foram coletadas e introduzidas em gaiolas, onde receberam por sete dias pasta proteica contendo 70% de pólen de girassol oriundo de plantas tratadas ou não com o fungicida Fox Xpro, que contém os princípios ativos bixafem, protioconazol e trifloxistrobina. Além do alimento proteico, as abelhas receberam xarope energético acrescido ou não com 6,25% de extrato aquoso de própolis verde. Em seguida, foi analisada por meio de PCR em tempo real a expressão de genes inerentes à saúde das abelhas, usando tecido abdominal . Foram identificadas alterações causadas pelos fungicidas em genes ligados ao sistema de detoxificação (CAT, MnSOD, CuZnSOD, GST-1 e CYP3061), nutrição e longevidade (Vitelogenina e Hexamerina) e imunidade (Defensina-1, Abaecina, Hymenoptaecina e Apidaecina) causando o aumento ou a diminuição da expressão dos genes. A própolis não apresentou capacidade de mitigar os efeitos do fungicida sobre os genes e causou um aumento significativo da expressão de quase todos os genes. As abelhas suplementadas durante a fase de cria mostraram melhores resultados em comparação com as abelhas com alimentação restrita, apresentando menores alterações genéticas, maior sobrevida e maior teor de proteínas na hemolinfa.

Palavras-chave: bixafem, imunidade, nutrição, pólen, protioconazol, trifloxistrobina.

EFFECT OF NUTRITION AND GREEN PROPOLIS ON BIOLOGICAL ASPECTS IN HONEY BEES EXPOSED TO THE FUNGICIDE FOX XPRO

ABSTRACT

The uncontrolled use of pesticides has caused a significant loss of bees, both those found in the wild and those managed in apiaries. This has led to a decrease in bee production and the contamination of their products. The objective of this study was to evaluate, through gene expression, whether or not nutritional supplementation with propolis can mitigate the harm to the health of bees exposed to a triple-action fungicide. During 22 weeks, five colonies had their feed supplemented with protein paste and energy syrup while another five colonies did not receive food supplementation and had restricted access to pollen. After this period, newly emerged bees were collected and introduced into cages, where they received for seven days a protein paste containing 70% of sunflower pollen from plants treated or not with the fungicide Fox Xpro, which contains the active ingredients bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin. In addition to the protein food, the bees received energy syrup with or without 6.25% of aqueous extract of green propolis. Next, the expression of genes inherent to bee health was analyzed, by means of real-timePCR, from abdomens without the digestive tract of honey bees. Alterations caused by fungicides were identified in genes linked to the detoxification system (CAT, MnSOD, CuZnSOD, GST-1 and CYP3061), nutrition and longevity (Vitellogenin and Hexamerin) and immunity (Defensin-1, Abaecin, Hymenoptaecin and Apidaecin) causing an increase or decrease in the expression of genes. Propolis did not show the ability to mitigate the effects of the fungicide on genes and caused a significant increase in the expression of almost all genes. Bees supplemented during the rearing phase showed better results compared to bees with restricted feeding, showing fewer genetic alterations, longer survival and higher protein content in the hemolymph.

Keywords: bixafem, immunity, nutrition, pollen, prothioconazole, trifloxystrobin

Capítulo 1 – Considerações Gerais

1.1 Introdução

As abelhas são essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas, pois são responsáveis pela polinização de uma vasta gama de plantas, tanto na natureza quanto na agricultura. Com mais de 20.000 espécies, elas desempenham um papel crucial na preservação da biodiversidade das florestas e no cultivo de alimentos. Ao longo de milhares de anos, as abelhas e as plantas evoluíram juntas, criando uma relação de especialização mútua. Algumas plantas dependem diretamente das abelhas para sua reprodução, especialmente através do processo de polinização, no qual as abelhas transferem o pólen entre as flores, permitindo a fertilização e a produção de sementes. Assim, as abelhas não apenas sustentam a diversidade das plantas, mas também são fundamentais para a produção de alimentos, garantindo colheitas abundantes e saudáveis. (Freitas et al, 2016).

Embora outros insetos também desempenhem papel na polinização, as abelhas se destacam pela sua especialização nessa atividade, sendo essenciais tanto para as culturas agrícolas quanto para a conservação da biodiversidade vegetal em diferentes áreas (Moritz et al., 2010). A especialização em polinização se dá através de uma combinação de características físicas, comportamentais e evolutivas. Seus corpos possuem pelos e suas patas possuem corbiculas para facilitar o transporte de pólen (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010). Algumas abelhas, como os zangões, utilizam a polinização vibratória, onde vibram flores para liberar o pólen (Vallejo-Marín, 2021). Plantas e abelhas coevoluíram juntas para mutuo benefício: plantas atraem abelhas com cores, aromas e estruturas florais, enquanto as abelhas garantem a transferência eficiente de pólen (Villalobos et al., 2019).

Para a colônia, a busca pelo alimento das abelhas é uma necessidade que impulsiona toda a atividade incessante das abelhas. A polinização é crucial para que as plantas se reproduzam, mas para as colônias de abelhas, é apenas um efeito secundário. Para elas, a polinização é uma fonte de recursos que surge como resultado natural da busca incessante por néctar e pólen (Patel et al., 2021).

Os serviços de polinização animal aumentam a produção global de culturas em

um valor adicional de 235–577 bilhões de dólares, isso tem recebido mais atenção do que outros produtos das abelhas, especialmente nos Estados Unidos, onde o aluguel de colmeias para polinização é amplamente praticado e representa o principal produto da apicultura regional. No entanto, desde o século XX, tem sido observado um declínio na população de abelhas, o que se tornou motivo de preocupação global e objeto de extensas pesquisas. Este declínio acelerado das abelhas representa uma ameaça à segurança alimentar mundial. Diversos fatores têm sido apontados como responsáveis por esse declínio, incluindo doenças, parasitas, enfraquecimento das colônias, desnutrição, agrotóxicos, perda e fragmentação de habitats, bem como outros fatores causados pela atividade humana (Johnson et al., 2010; Freitas et al., 2016).

A dificuldade de conseguir uma dieta equilibrada tem sido um dos fatores mais apontados, sendo ela, essencial para o crescimento e desenvolvimento das colônias de abelhas, consideradas superorganismos. A nutrição das abelhas é dividida em três níveis interligados: nutrição da colônia, dos adultos e das larvas. Um desequilíbrio em qualquer desses níveis pode prejudicar os outros e potencialmente levar ao colapso da colônia (Carrol et al., 2017). As reservas alimentares na colmeia são cruciais para a sobrevivência das abelhas, influenciando suas estratégias de forrageamento e cuidado com a cria, conforme as necessidades de proteínas, carboidratos, aminoácidos e outros nutrientes (Alaux et al., 2010).

As abelhas também coletam resinas e produzem própolis, que é uma mistura de secreções vegetais com propriedades antibacterianas, contribuindo para a imunidade social da colmeia. Embora muitos estudos enfoquem os benefícios da própolis para os humanos, há menos pesquisas sobre sua função como defesa da colônia contra patógenos (Simone-Finstrom e Spivak, 2010). Além disso, a própolis também reduz rachaduras, impermeabiliza, previne fungos e ajuda a controlar a temperatura e umidade do ninho (Simone-Finstrom et al., 2017).

Os fatores responsáveis pelo declínio das abelhas não atuam isoladamente; na maioria das vezes, eles estão interconectados e causam um efeito sinérgico prejudicial nos insetos. Um exemplo disso é a desnutrição decorrente de extensas áreas de monocultura combinada com a aplicação excessiva de fungicidas e outros

agrotóxicos, o que resulta em efeitos negativos sobre as colônias. Em situações graves, essa combinação pode enfraquecer ou até mesmo causar a morte das colônias (Rondeau e Raine, 2022).

1.2 Biologia social das abelhas

Como um dos polinizadores mais importantes tanto para as produções agrícolas quanto para as florestas nativas, a abelha *Apis mellifera* L. (1758) não pode ser subestimada ou negligenciada. Com uma distribuição natural que inclui a Europa, o Oriente Médio, a África e partes da Ásia, hoje em dia a *Apis mellifera* demonstrou uma notável capacidade de adaptação ambiental, conseguindo estabelecer-se em praticamente todos os biomas terrestres habitáveis, independentemente das variações climáticas e das características das vegetações locais, sendo que agora ela ocorra em todos os continentes, exceto na Antártica (Tihelka et al, 2020, Marcelino et al., 2022).

A introdução das abelhas africanizadas no Brasil exemplifica uma invasão biológica significativa. Em 1956, pesquisadores brasileiros trouxeram as subespécies *Apis mellifera scutellata* e *Apis mellifera adansonii*, oriundas da África do Sul e Tanzânia, para o estado de São Paulo, com o objetivo de um programa de melhoramento genético. As abelhas europeias presentes no Brasil não estavam bem adaptadas ao clima tropical, e a meta era criar um híbrido mais adequado às condições locais. Contudo, em 1957, algumas rainhas africanas escaparam acidentalmente e começaram a se cruzar com as abelhas europeias, resultando nas abelhas africanizadas (Byatt et al., 2016).

A introdução das abelhas africanizadas no Brasil exemplifica uma invasão biológica significativa. Em 1956, pesquisadores brasileiros trouxeram as subespécies *Apis mellifera scutellata* e *Apis mellifera adansonii*, oriundas da África do Sul e Tanzânia, para o estado de São Paulo, com o objetivo de um programa de melhoramento genético. As abelhas europeias presentes no Brasil não estavam bem adaptadas ao clima tropical, e a meta era criar um híbrido mais adequado às condições locais. Contudo, em 1957, algumas colônias africanas escaparam

acidentalmente e começaram a se cruzar com as abelhas europeias, resultando nas abelhas africanizadas (Rinderer e Hellmich, 1991).

Essas abelhas se espalharam rapidamente por toda a América do Sul e Central, formando grandes populações selvagens e deslocando as abelhas europeias, exceto em áreas temperadas, onde sua adaptação é limitada. A rápida expansão das abelhas africanizadas trouxe novos desafios para a apicultura e a saúde pública devido à sua natureza mais defensiva (Calfee et al., 2020). As abelhas possuem desenvolvimento holometabólico, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Na colônia de abelhas, existem três castas adultas: rainha, operária e zangão. Embora relacionadas, essas castas apresentam diferenças marcantes em vários aspectos (Zhao et al., 2020).

A rainha é a abelha responsável pela produção de descendentes dentro da colônia. A maioria das operárias não se reproduz, isso apenas ocorre em situações em que a colônia fica sem uma rainha, a ausência dos feromônios da rainha permite que algumas operárias desenvolvam seus ovários. Essas operárias então começam a depositar ovos não fertilizados, que se tornam zangões. Esse processo pode causar um colapso social na colônia, levando-a à ruína (Peso et al., 2016).

As abelhas ocupam diferentes funções dentro da colônia, cada uma desempenhando um papel específico na sociedade. Isso inclui as abelhas operárias, que são responsáveis por diversas tarefas, como cuidado com as larvas, produção de mel, coleta de recursos e defesa da colônia. Quanto à longevidade, as operárias têm uma vida curta, variando de duas a três semanas, devido ao desgaste causado pelo trabalho. Por outro lado, a rainha é o indivíduo que possui a vida mais longa, podendo viver até 5 anos (Wegener et al., 2022).

A rainha é a única abelha na colônia que se reproduz, copulando com múltiplos zangões e armazenando esperma na spermateca. Ela deposita os ovos que dão origem a novas abelhas. Seu desenvolvimento dura 16 dias: três dias como ovo, seis dias como larva alimentada com geleia real e sete dias como pupa. Após esse período, ela emerge como adulta, pesando entre 178-292 mg. (Smith, 2008).

Os zangões são maiores que as operárias, com o dobro do tamanho, e desenvolvem-se em 24 dias: três dias como ovo, seis como larva e quinze como pupa.

A quantidade de zangões varia de zero a mil, dependendo da comida disponível. Eles se desenvolvem de ovos não fertilizados, sendo haploides, e sua função principal é copular com rainhas virgens de outras colônias. Zangões adultos pesam entre 196 e 225 mg (Page e Peng, 2001; Winston, 1987).

As operárias são as menores e mais numerosas abelhas da colônia, podendo ultrapassar 50 mil indivíduos. Elas realizam diversas funções baseadas na idade e nas necessidades da colônia. Seu desenvolvimento dura 21 dias: três dias como ovo, seis como larva e doze como pupa, emergindo com peso entre 81 e 151 mg (Kerr et al., 1956). A divisão de tarefas é influenciada por feromônios como etil oleato (EO) e hormônio juvenil (JH) (Comper e Eberl, 2020), além de fatores como idade, experiências individuais e condições da colônia (Linksvayer et al., 2009; Crailsheim e Schmicki, 2004).

As abelhas conhecidas como "limpadoras de células" são operárias com até três dias de vida e constituem o grupo menos especializado em termos de aptidão para o trabalho na colônia. Devido às suas limitações fisiológicas por ainda estarem desenvolvendo seus corpos, elas são designadas para a tarefa mais simples, que é limpar as células dos favos, preparando-os para a postura da rainha. Outras castas também podem desempenhar essa função (Seeley, 1982). A transição dessas abelhas para a próxima atividade é um processo de desenvolvimento fixo que não varia, mesmo em situações adversas no ninho (Amdam e Omholt, 2003).

A partir do quarto dia de vida, as abelhas passam a desempenhar o papel de nutrizas ou enfermeiras, uma função que exercem por cerca de uma semana. Nessas funções, elas produzem e fornecem alimentos para larvas, rainha, zangões e operárias, incluindo as forrageiras (Crailsheim, 1992). Para isso, digerem pólen, néctar e mel para sintetizar um fluido chamado geleia real. Esta geleia é secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares, especializadas para essa tarefa (Hanser & Rembold, 1964). As glândulas mandibulares, situadas na cabeça das abelhas próximas às mandíbulas, possuem células secretoras e um reservatório bifurcado. Essas glândulas são essenciais para a produção de geleia real, que contém açúcares, secreções das glândulas mandibulares e proteínas (Salles e Cruz-Landim, 2004).

Além de cuidar da alimentação das larvas, as abelhas nutrizas têm a

responsabilidade de cuidar da rainha, formando um agrupamento ao redor dela. Elas regulam o comportamento da rainha controlando a taxa de alimentação e atuam como mensageiras, espalhando os feromônios da rainha por todo o ninho (Winston, 1987). Acredita-se que a proporção de larvas cuidadas por nutrízes possa ser o principal fator que determina quando essa casta passa para a próxima fase, sendo que, quanto maior essa proporção, mais tempo essas abelhas permanecem nesse papel (Amdam e Omholt, 2003).

Pesquisas conduzidas por Milojevic (1940) e Haydak (1963) revelaram que as abelhas nutrízes podem permanecer nessa função mesmo em estágios avançados de vida, desde que haja a necessidade de uma maior de abelhas nessa função dentro da colônia. Esses estudos destacam a plasticidade comportamental das abelhas e a capacidade da colônia de se adaptar às necessidades de criação de abelhas nutrízes, mesmo em estágios posteriores do ciclo de vida das abelhas adultas.

Por volta do décimo segundo dia de vida, as abelhas assumem outra função e são chamadas de engenheiras. Nesta etapa, que se estende por cerca de 10 dias, possuem uma variedade de tarefas dentro do ninho, compreendendo aproximadamente 15 atividades, desde a construção e manutenção dos favos até o processamento do néctar e a guarda do alvado (Johnson, 2003; Seeley, 1982). Essa função pode ser dividida em duas categorias com uma variação contínua entre elas: as abelhas mais jovens tendem a dedicar mais tempo a tarefas estruturais, como a construção de favos e a manutenção da colônia, enquanto as mais velhas se concentram mais no recebimento e processamento de néctar, além de atividades que as coloquem mais perto da entrada da colmeia (Seeley, 2009).

A construção e manutenção dos favos dependem do espaço disponível no ninho para a postura de ovos e armazenamento de mel (Pratt, 1998). A nutrição das abelhas está ligada à sua casta na colmeia. As abelhas forrageiras coletam néctar e transferem para as abelhas engenheiras. O número de abelhas envolvidas nessa transferência se ajusta conforme a taxa de forrageamento, comunicada através de uma dança trêmula que recruta mais abelhas quando necessário (Seeley, 1992). A transição para a fase de forrageiras é complexa e enfrenta desafios como balancear a produtividade, garantir a substituição constante de forrageiras e ajustar a população

conforme a disponibilidade de néctar (Johnson, 2010; Ament et al., 2010).

A última função desempenhada pelas abelhas com 22 dias de idade ou mais, é a de forrageadora. Elas são as mais velhas e as únicas a realizarem atividades fora do ninho (Winston, 1987). Essas abelhas dedicam seu tempo à busca de recursos essenciais para a sobrevivência da colônia, principalmente pólen, néctar, água e matéria prima da própolis. O néctar e o pólen são os recursos que demandam mais tempo de forrageamento, exceto em situações de extremo calor, quando a coleta de água se torna a principal prioridade devido a grande demanda de água para esse fim (Seeley, 2009).

As abelhas são alvo de intensas pesquisas sobre sua comunicação, especialmente por meio das danças que realizam para compartilhar informações sobre a localização de alimentos e água, bem como para selecionar locais adequados para instalação do enxame durante a enxameação (Vischer, 2007). As forrageadoras, que possuem musculatura desenvolvida no tórax e a mais alta taxa metabólica entre as operárias, trabalham por algumas semanas até a morte, sendo constantemente substituídas para manter o fluxo de recursos para a colônia (Johnson, 2010).

Essas abelhas precisam de carboidratos como fonte de energia, que são transformados em glicose e podem ser convertidos em gordura corporal. Uma operária consome cerca de 11 mg de açúcar por dia (Huang et al., 1998). O néctar, principal fonte de carboidratos na dieta das abelhas, varia sua concentração de açúcares entre 25% e 40% (Huang et al., 1998). As abelhas forrageiras coletam o néctar usando sua glossa e o armazenam no papo até entregá-lo às abelhas engenheiras ou nutrizes. O papo é uma estrutura que trabalha em conjunto com o pró-ventrículo, funcionando como uma válvula unidirecional que permite que o néctar seja liberado do papo sem risco de contaminação pelo refluxo do intestino médio (Huang, 2010).

Ao realizar a coleta do néctar, algumas enzimas, como a invertase e a glicose oxidase, são adicionadas para iniciar o processamento desse líquido antes mesmo da chegada ao ninho. A invertase converte a sacarose em glicose e frutose, sendo que a glicose é posteriormente modificada pela glicose oxidase, resultando em dois produtos químicos: ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Ambas as substâncias

tornam o mel hostil para bactérias e fungos (Huang, 2010; Haydak, 1970).

As abelhas engenheiras que recebem o néctar iniciam sua desidratação no aparelho bucal, formando uma grande gota entre a língua e a mandíbula, depositando-a nas células do favo. Então é realizado um processo chamado ventilação, que consiste na criação de uma corrente de ar provocada pela movimentação das asas dessas abelhas, que promove a evaporação da água presente no néctar (Jones e Oldroyd, 2006). No momento em que o teor umidade desse néctar chega a um valor entre 16% e 20%, ponto em que ele se transforma em mel, as abelhas o selam nas células com cera para preservá-lo e protegê-lo contra contaminação e reabsorção de umidade proveniente do ambiente. Nessa fase final, o mel apresenta uma composição média de açúcares com cerca de 38% de frutose, 31% de glicose e o restante de di e trissacarídeos (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

O pólen é essencial para a dieta das abelhas, fornecendo proteínas, minerais, vitaminas e lipídios necessários para a sua nutrição. Uma colônia de abelhas pode coletar entre 10 a 26 quilogramas de pólen por ano, que serve como a principal fonte de proteína e fornece aminoácidos essenciais que as abelhas não podem sintetizar (Huang, 2010). A escassez de pólen ou a baixa qualidade nutricional pode levar a uma queda na produção de cria, diminuição da sobrevivência das operárias e declínio da população da colônia (Kleinschmidt e Kondos, 1976).

Quando as abelhas forrageiras visitam flores, o pólen adere aos seus corpos e é removido pelas pernas dianteiras e intermediárias, formando bolotas que são transferidas para a corbícula nas pernas traseiras para transporte ao ninho (Haydak, 1970; Huang, 2010). No ninho, essas bolotas são descarregadas em células específicas, onde outras abelhas operárias compactam o pólen até formar uma pasta (Herbert e Shimanuki, 1978). Durante a primavera e o verão, grandes quantidades de pólen e néctar são coletadas para produzir mel e "*bee bread*", uma mistura de pólen, néctar e enzimas, armazenada para garantir recursos durante períodos de escassez (DeGrandi-Hoffman e Hagler, 2000).

É fundamental compreender todos os aspectos que influenciam a nutrição das abelhas para assegurar sua vitalidade e o papel essencial que desempenham nos ecossistemas e na agricultura. Ao analisarmos os efeitos de diversos fatores

ambientais e práticas agrícolas na dieta das abelhas, podemos desenvolver estratégias eficazes para proteger esses importantes polinizadores. Essas medidas são cruciais para preservar a diversidade e a saúde dos ecossistemas nos quais dependemos para a produção de alimentos e para manter o equilíbrio ambiental.

1.3 Nutrição das abelhas

A importância de uma dieta equilibrada é fundamental para a expansão e o desenvolvimento das colônias de abelhas. Muitas vezes consideradas superorganismos, as colônias de abelhas têm sua nutrição dividida em três níveis principais: a nutrição da colônia, a nutrição dos adultos e a nutrição larval; todas interligadas de maneira direta. Qualquer desequilíbrio em uma fase pode afetar negativamente as outras, potencialmente levando ao colapso das colônias (Carrol, et al., 2017). As reservas alimentares dentro das colmeias são recursos vitais para a sobrevivência das abelhas, tanto para as larvas quanto para os adultos, que adaptam suas estratégias de forrageamento e cuidado com a cria de acordo com as necessidades de proteínas, carboidratos, aminoácidos e outros nutrientes (Alaux et al., 2010).

Abelhas operárias adultas têm alta demanda por energia, mas possuem reservas limitadas de glicogênio (0,05 a 0,47 mg por abelha). Para suprir suas necessidades energéticas, elas dependem das reservas alimentares da colônia ou realizam trofalaxia. Cada operária necessita de cerca de 4 mg de açúcares por dia para sobreviver. As forrageadoras têm enzimas que permitem a utilização de polissacarídeos, como o amido, durante atividades de alto gasto energético, como o voo (Hrassnigg e Crailsheim, 2005).

Alguns açúcares, como manose, galactose, arabinose, xilose, melibiose, rafinose, estaquiose e lactose são tóxicos para as abelhas e podem ser encontrados em quantidades relevantes no pólen, néctar de algumas plantas, como as da família das Tiliaceae, e em exsudatos de tulipas (Brodschneider e Crailsheim, 2010). Aproximadamente 40% dos açúcares encontrados na soja, comumente usados como substitutos do pólen, são tóxicos para as abelhas. No

entanto, essa toxicidade pode ser reduzida quando as abelhas têm uma grande quantidade de néctar disponível ou quando os carboidratos são diluídos experimentalmente para menos de 4% em uma solução de sacarose a 50% (Barker, 1977).

Outra substância tóxica conhecida é o Hidroximetilfurfural (HMF), que se forma a partir do tratamento térmico ou armazenamento inadequado de açúcares, induzindo uma desidratação catalisada pelos ácidos de açúcares hexose, como a frutose. O nível máximo considerado adequado de HMF é de 30 ppm. Em níveis mais altos, como 150 ppm, a mortalidade das abelhas no vigésimo dia de vida foi de 15%, em comparação com cerca de 12,5% no grupo controle, que recebeu alimento com 30 ppm de HMF (Jachimowicz e El Sherbiny, 1975).

As larvas são cuidadosamente monitoradas pelas abelhas enfermeiras para garantir que tenham alimento suficiente durante todo o seu desenvolvimento. Elas precisam receber alimento com teor de açúcares de 18% nos primeiros três dias de desenvolvimento e 45% nos dois últimos dias (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Durante todo o seu período de crescimento, as larvas recebem cerca de 60 mg de carboidratos (Rortais et al., 2005). A alimentação inadequada e a deficiência de carboidratos limitam o número de crias, levando a um estresse populacional na colônia, especialmente quando as fontes de néctar são insuficientes e os estoques estão esgotados devido às condições climáticas desfavoráveis ou falta de diversidade floral (Alaux et al., 2010).

Os carboidratos são regularmente suplementados nas colônias com soluções de sacarose, açúcar invertido, xarope de milho rico em frutose e vários xaropes de frutas, por meio do uso de alimentadores internos ou externos acoplados ao alvado (Jachimowicz e El Sherbiny, 1975). O xarope fornecido é coletado pelas abelhas e integrado ao fluxo alimentar da colônia, sendo armazenado nos favos para uso futuro. Nos alimentadores externos, as abelhas que consomem o xarope são geralmente jovens e não forrageiras, enquanto nos alimentadores internos, as mesmas abelhas que recebem o néctar também consomem o xarope (Free, 1965; DeGrandi-Hoffmann e Hagler, 2000;

Brodschneider et al., 2007).

O pólen é a fonte natural de proteína para as abelhas, com seu nível proteico variando de acordo com diversos fatores, como espécie da planta do qual o pólen é coletado, clima e região. O pólen é processado junto com mel para se tornar o pão-de-abelha, que possui um valor nutritivo ainda maior que o pólen fresco recém-coletado ou congelado, como também uma melhor digestibilidade, devido à fermentação realizada por bactérias do ácido láctico presentes no estômago das abelhas (Nicolson et al., 2013).

As proteínas representam uma parte significativa da matéria seca das abelhas adultas, com cerca de 66 a 74% nos primeiros dias de vida, porcentagem que diminui à medida que a abelha envelhece. As operárias consomem diariamente de 3,4 a 4,3 mg de pólen, com maior ingestão durante a fase de nutriz. A concentração de proteínas na hemolinfa também varia, sendo maior nos primeiros dias de vida e dependente da estação do ano (Frias et al., 2016).

Para que as larvas passem por todo o processo de desenvolvimento, são necessários entre 25 a 37,5 mg de proteína ou 125 a 187,5 mg de pólen, obtidos através da geleia de operária. A geleia é processada pelas abelhas nutrizas e administrada às larvas de acordo com sua idade. Na falta desse alimento, a colônia interrompe o ciclo de formação de novas crias para evitar complicações e distúrbios na fase adulta das abelhas, que não conseguiriam se transformar em adultos ou se tornariam menos aptas para as tarefas que deveriam desempenhar, em virtude da alimentação inadequada. A composição da geleia consiste de água, proteínas, açúcares simples, lipídios e uma variedade de minerais essenciais (Sabatini et al., 2009).

A quantidade de aminoácidos na composição das proteínas está diretamente ligada à capacidade de crescimento das abelhas. Os seguintes aminoácidos e suas proporções essenciais para o desenvolvimento até a fase adulta são: arginina (3,0%), histidina (1,5%), lisina (3,0%), triptofano (1,0%), fenilalanina (2,5%), metionina (1,5%), treonina (3,0%), leucina (4,5%), isoleucina (4,0%) e valina (4,0%) (De Groot, 1953). É importante notar que aminoácidos

como serina, glicina e prolina, embora não sejam considerados essenciais para o desenvolvimento das abelhas, ainda têm um papel significativo no estímulo ao crescimento. Mesmo quando presentes em quantidades abaixo do ideal, esses aminoácidos podem influenciar positivamente o desenvolvimento das abelhas, contribuindo para a sua saúde e vitalidade. Portanto, apesar de não serem considerados essenciais, seu fornecimento adequado na dieta das abelhas pode ter um impacto positivo no crescimento e na produtividade da colônia (Haydak, 1970). Além disso, é importante destacar que as abelhas têm maiores necessidades de aminoácidos essenciais como leucina, isoleucina e valina. Limitações na disponibilidade desses aminoácidos na proteína alimentar podem afetar significativamente o crescimento e desenvolvimento de toda a colônia de abelhas (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

A demanda proteica pode ser substituída a partir de dietas artificiais com alto nível proteico que contêm pólen ou dietas artificiais contendo substitutos do pólen, como: proteína de soja, levedura de cerveja, leite, algas, entre outros (Standifer et al., 1977). Os substitutos do pólen têm se apresentado uma opção mais econômica e mais seguros para a formulação dessas dietas, já que o pólen usado em dietas é retirado de outras colônias trazendo consigo o risco de contaminação por algum agente patogênico. Por outro lado, são consumidos com maior facilidade do que os substitutos por conta dos fagoestimulantes encontrados no pólen, tornando-o mais interessantes para as abelhas (Schmidt e Hanna, 2006).

Os macronutrientes, como carboidratos e proteínas, têm sido alvo de extensa pesquisa devido à sua importância conhecida na dieta das abelhas. No entanto, a ingestão adequada de lipídios, vitaminas e minerais também é crucial para a saúde das abelhas. Embora esses nutrientes sejam essenciais, suas necessidades específicas e os níveis ideais ainda não foram completamente explorados (Haydak, 1970). Em particular, o lipídio, que é exclusivamente obtido pelas abelhas a partir do pólen, pode variar consideravelmente em sua concentração, de 0,8% a 18,9%. Além de fornecer energia, o lipídio desempenha um papel importante na atração das abelhas para a coleta de pólen. Para

compensar variações na disponibilidade de lipídios naturais, diversos óleos são frequentemente adicionados a dietas proteicas artificiais, imitando essa atratividade (Roulston e Cane, 2000). Estudos mostram que as abelhas aumentam a produção de crias quando 2 a 4% de extratos lipídicos do pólen são adicionados na dieta (Herbert et al., 1980). Principalmente durante a fase de cria das abelhas, é o momento em que os lipídios são metabolizados, sendo também considerados uma importante fonte de energia e precursor para biossíntese posterior (Cantrill et al., 1981).

Os esteróis, grupo de compostos orgânicos que possuem uma estrutura característica de anéis de carbono fundidos e um grupo funcional hidroxila (-OH) em uma das extremidades da molécula, são obtidos através do pólen e também são essenciais para as abelhas. As operárias convertem fitoesteróis em 24-metilenocolesterol, sitosterol e isofucosterol, não podendo fazer essa conversão para colesterol. As abelhas nutrizas têm a habilidade única de transferir esteróis seletivamente para as larvas durante seu desenvolvimento, mantendo assim níveis constantes desses compostos, principalmente de 24-metilenocolesterol. Para tanto, as abelhas nutrizas apresentam altos estoques de lipídios abdominais que são gradativamente esgotados antes do início da fase de forrageamento (Svoboda et al., 1986).

Quando ocorre uma emergência na colmeia e abelhas forrageiras precisam se tornar abelhas nutrizas, elas podem não conseguir recuperar os estoques elevados de lipídios presentes em seus abdomens. Isso sugere que o desempenho dessas abelhas nutrizas podem ser reduzido ou até mesmo insuficiente. Esses lipídios abdominais são importantes fontes de energia e nutrientes essenciais para as abelhas nutrizas durante a produção de geleia real e o cuidado com as larvas. Portanto, a incapacidade de recuperar esses estoques de lipídios pode comprometer a capacidade das abelhas nutrizas de desempenhar suas funções de maneira eficaz, afetando assim o desenvolvimento e a saúde da colmeia como um todo. (Toth e Robinson, 2005).

As vitaminas solúveis em água são comuns no pólen, sendo sua presença influenciada pela diversidade das fontes florais e sua disponibilidade sazonal. Por

outro lado, as vitaminas solúveis em gordura podem variar ao longo das estações, também dependendo da diversidade das fontes florais. Estudos indicam que a vitamina C, por exemplo, está presente no pólen, mas também pode ser encontrada em pré-pupas em dietas com ou sem restrição dessa vitamina. Isso sugere a possibilidade de que as abelhas ou seus microrganismos simbióticos possam sintetizá-la, assim como outras vitaminas (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Entretanto, alguns nutrientes, como a piridoxina (vitamina B6), são cruciais para o desenvolvimento adequado das larvas. Estima-se que seja necessário aproximadamente 4 mg de piridoxina em 500 g de alimento para garantir um desenvolvimento saudável. Além disso, é sugerido que uma quantidade mínima de 5,4 µg de piridoxina seja necessária para que uma larva alcance o estágio de ser operculada (Anderson e Dietz, 1976). Além das vitaminas solúveis em água, a adição de vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, à dieta das abelhas pode enriquecer substancialmente a produção de crias. Mesmo que essas vitaminas não sejam consideradas essenciais, a inclusão delas na dieta pode promover um aumento notável na produção de larvas. Estudos indicam que esse enriquecimento pode ser observado mesmo ao adicionar apenas uma dessas vitaminas à dieta das abelhas (Herbert e Shimanuki, 1978).

As concentrações de minerais no pólen variam conforme a fonte floral, mas os minerais podem ser encontrados em níveis semelhantes em abelhas alimentadas com dietas com escassez ou abundância de pólen. Isso sugere múltiplas fontes de minerais na dieta, como néctar, água e possivelmente agrupamentos minerais endógenos em abelhas adultas (Silveira, 2012). Herbert e Shimanuki (1978) mostraram que adicionar 1% de cinzas em uma dieta sintética aumenta significativamente a quantidade de crias, mas níveis acima de 2% podem ser prejudiciais. Esses autores também indicam que uma dieta equilibrada em minerais requer 1.000 ppm de potássio, 500 ppm de cálcio, 300 ppm de magnésio e 50 ppm de sódio, zinco, manganês, ferro e cobre.

A desnutrição em abelhas pode causar vários problemas na colônia, especialmente quando combinada com a exposição a agrotóxicos como

fungicidas, inseticidas e herbicidas. Esses estressores podem afetar o comportamento de forrageamento e voo das abelhas, prejudicar sua reprodução e imunidade, e aumentar a vulnerabilidade a doenças. Esse efeito combinado pode enfraquecer a colônia e, em casos graves, levar ao seu colapso (Hernández et al., 2021). A saúde imunológica das abelhas é essencial para protegê-las contra doenças, e uma boa nutrição é crucial para manter essa imunidade (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

1.4 Saúde das abelhas

As abelhas possuem apenas o sistema imunológico inato, que inclui mecanismos de defesa como barreiras físicas e celulares, e uma resposta humoral. A resposta inata utiliza defensores celulares, como os hemócitos, que realizam fagocitose e encapsulamento para combater patógenos. A resposta humoral inata das abelhas inclui peptídeos antimicrobianos (AMPs) e proteínas de fase aguda, que ajudam a neutralizar toxinas e patógenos (Murphy, 2017). A imunidade inata é codificada diretamente na linha germinativa e transmitida para a prole (Larsen et al., 2019).

Os hemócitos são os principais agentes da imunidade celular nas abelhas, transportados pela hemolinfa e responsáveis por processos como fagocitose, encapsulamento e melanização. Eles também sintetizam e armazenam efetores humorais, como os peptídeos antimicrobianos, associados a outros efetores solúveis do sistema imunológico (Larsen et al., 2019). Esses mecanismos celulares visam neutralizar corpos estranhos, como partículas infecciosas, através da fagocitose, na qual os hemócitos engolfam e eliminam esses agentes (Strand, 2008). Quando os agentes estranhos são maiores, desencadeiam o processo de nodulação ou encapsulamento, que envolve o agrupamento e a ruptura parcial de hemócitos na superfície do agente, liberando substâncias que atuam como antioxidantes para minimizar qualquer dano (Strand, 2008).

Os hemócitos podem ser classificados em quatro subgrupos: pró-hemócitos, hemócitos de coágulo, células granulares e oenocitóides. Os dois últimos grupos

estão relacionados à melanização, um processo que ocorre durante e após o encapsulamento. A melanização consiste em uma série de processos humorais e celulares que têm como objetivo agir sobre lesões causadas por patógenos, limitando sua propagação e retendo-os para eliminação (Strand, 2008; Dubovskiy, 2016).

A profenoloxidase (proPO) é uma proteína presente na hemolinfa das abelhas que desempenha um papel crucial na melanização. Sua ativação começa com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) presentes nos hemócitos. Isso desencadeia um processo de adesão aos agentes estranhos, resultando na formação de uma bainha sobreposta e na liberação de enzimas para desgranular ou lisar os agentes (Dubovskiy, 2016; Larsen et al., 2019). Nas abelhas melíferas, apenas um gene codifica a proPO, sendo expresso de forma mais intensa em abelhas adultas do que em larvas ou pupas (Lourenço et al., 2013).

A resposta humoral é mediada por produtos químicos e peptídeos antimicrobianos (AMPs), proteínas pequenas e altamente conservadas que são produzidas e liberadas na hemolinfa em resposta a infecções bacterianas, fúngicas e virais (Strand, 2008). Esses efetores humorais podem ser produzidos em diferentes células, como hemócitos, células epiteliais e glândulas salivares, mas o corpo gorduroso da cavidade dorsal é o principal órgão de síntese de efetores (Schlüns e Crozier, 2007).

As abelhas possuem quatro famílias de AMPs que atuam de forma ampla na hemolinfa: apidaecina, abaecina, himenoptaecina e defensina. A apidaecina possui treze sequências de cDNA que codificam quatro peptídeos distintos, de AcAp1 a AcAp4. A abaecina possui onze sequências de cDNA, que codificam apenas dois peptídeos, denominados AcAb1 e AcAb2. A himenoptaecina é a família com o maior número de sequências, totalizando 34 delas, que codificam 13 peptídeos diferentes. Por fim, as defensinas são os menores AMPs e agem principalmente contra bactérias gram-negativas, embora também possam afetar as gram-positivas e fungos. Essa família possui 29 sequências de cDNA, codificando 29 peptídeos, da defensina-1 até a defensina-29 (Xu et al., 2009; Larsen et al., 2019). A expressão gênica tem sido amplamente empregada nos últimos anos para diagnosticar os efeitos dos estressores

tanto no estresse oxidativo quanto no sistema imunológico das abelhas. O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que quantifica o mRNA específico do gene, é o método de análise mais utilizado devido à sua relativa velocidade, sensibilidade, replicabilidade e precisão. Ele se tornou o método ideal para analisar o padrão de expressão gênica das abelhas melíferas (Ling et al., 2011; Jeon et al., 2020).

O comportamento higiênico é uma característica essencial, que também deve ser destacado, correspondendo à uma série de comportamentos individuais que contribuem para a imunidade social, um fenômeno presente em muitos insetos sociais, incluindo abelhas, formigas, vespas e cupins. Isso inclui uma variedade de ações, como cuidar dos companheiros do ninho, remover detritos, a "febre social" para eliminar patógenos e o próprio comportamento higiênico (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

O comportamento higiênico é caracterizado pela habilidade das abelhas de detectar, neutralizar e remover rapidamente potenciais ameaças ao ninho, sendo principalmente realizado por abelhas engenheiras ou de meia idade. Isso inclui a remoção de crias infectadas por doenças bacterianas e fúngicas, como *Paenibacillus larvae* e *Ascosphaera apis*, antes que possam se espalhar, além da retirada de partes de crias infectadas pelo parasita *Varroa destructor* (Spivak et al., 2003). Esse comportamento ajuda a limitar a propagação de infecções e reduzir a reprodução de ácaros, sendo que colônias com alto nível desse comportamento são consideradas de alto valor econômico na apicultura (Spivak e Reuter, 1998). A expressão desse comportamento também pode variar em nível de colônia, como as características de rapidez e eficiência na retirada de crias deficientes, doentes ou mortas podem ser influenciadas pela quantidade de recursos e pela porção de abelhas aptas a realizar essa tarefa (Spivak et al., 2003).

Os termos "higiênico" e "não higiênico" são usados para classificar as colônias quanto a essa característica. Colônias com alto teor de higiene são aquelas em que as abelhas conseguem remover crias anormais com alta eficiência, com um índice de remoção superior a 80%. Assim, essas colônias raramente ou nunca apresentam sintomas clínicos de doenças específicas (Woodrow e Holst, 1942). Já em colônias não higiênicas, a remoção é realizada de forma lenta e quase ineficaz, com menos

abelhas dedicadas a essa atividade. Isso permite que um ou mais patógenos se espalhem pela colônia, levando ao desenvolvimento de sintomas clínicos ou até mesmo à morte (Woodrow e Holst, 1942).

Estudos realizados na década de 90 estimam que apenas 10% das colônias nos Estados Unidos e na Austrália apresentam comportamento higiênico com eficiência na remoção de crias acima de 80%. A reprodução seletiva, através da produção de rainhas com maior valor genético, pode aumentar a porcentagem de colônias que exibem esse comportamento de forma eficiente (Spivak et al., 2003).

Moretto (1988) estudou o comportamento higiênico das abelhas em São Paulo e encontrou que ele varia conforme a raça e as condições climáticas. A *A. mellifera* africanizada mostrou um comportamento higiênico mais pronunciado do que a abelha italiana, independentemente da localidade e do clima. O estudo também revelou que parasitas como a *Varroa destructor* se reproduzem mais na primavera, exigindo uma resposta mais eficaz das abelhas. Em um estudo na Bahia, abelhas africanizadas apresentaram uma frequência média de comportamento higiênico de 82,58% quando afetadas pela varroa, destacando o alto potencial genético dessas colônias. No entanto, a frequência variou de 52% a 96%, sugerindo a necessidade de melhor seleção genética para aprimorar essa característica nos apiários do país (Castagnino et al., 2016).

Outro mecanismo relacionado à imunidade social é a coleta e o uso de resinas pelas abelhas, resultando na produção de própolis. Essa substância é uma mistura de secreções vegetais com propriedades antibacterianas. Embora muitas pesquisas se concentrem nos constituintes químicos e nas propriedades biológicas da própolis para benefício humano, pouco se estudou sobre como essa coleta de antimicrobianos e sua incorporação no ninho contribuem como defesa em nível de colônia contra patógenos (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

Além de suas propriedades antimicrobianas, a própolis desempenha outras funções na colmeia, como redução de rachaduras, impermeabilização, prevenção do desenvolvimento de fungos nas paredes e controle da temperatura e umidade interna do ninho através da condensação (Simone-Finstrom et al., 2017).

As abelhas coletam resinas de pequenas gotículas encontradas nos troncos,

galhos de árvores, superfícies de algumas frutas ou ápices vegetais (Kumazawa et al., 2008). Elas retiram essas resinas dos tricomas e ductos vegetais, cortando folhas com suas mandíbulas. As abelhas que coletam resina preferem folhas jovens e botões, que têm uma composição química semelhante, em vez de folhas maduras, que oxidam ao longo do tempo e têm uma composição heterogênea. Além disso, elas mostram preferência pelo gênero da planta, com fêmeas sendo preferidas em relação aos machos (Park et al., 2004; Teixeira et al., 2005).

O processo de coleta de resina pelas abelhas segue quatro etapas simples: primeiro, elas quebram a resina em pedaços menores com as mandíbulas, em seguida, trabalham a resina moldando-a em forma de bolota nas mandíbulas; depois, transferem a bolota das patas dianteiras para as do meio; por fim, acomodam a bolota na corbícula (Meyer, 1956). Após essas etapas, as abelhas voam de volta para a fonte de resina para adicionar mais material à corbícula, embora a razão exata desse voo de retorno seja desconhecida, acredita-se que seja para a abelha avaliar o peso da carga na corbícula (Simone-Finstrom e Spivak, 2010). O processo completo de carga da corbícula leva cerca de sete minutos, em média, mas pode variar dependendo das condições climáticas (Teixeira et al., 2005). As abelhas forrageiras não conseguem coletar resina e pólen em uma única viagem, possivelmente devido ao peso excessivo à complexidade de realizar a divisão da carga na colônia (Armbruster, 1984).

Uma abelha totalmente carregada de resina pode levar cerca de 15 minutos para descarregá-la, mas em situações anormais, esse processo pode demorar até sete horas, podendo até se estender para a noite. O descarregamento requer a ajuda das abelhas engenheiras, que removem a resina das corbículas com suas mandíbulas, quebrando-a em pequenos pedaços. Esses pedaços são usados principalmente para revestir as paredes da colmeia ou, em menor quantidade, para outros fins secundários, como revestir células do favo. Embora a própolis tenha propriedades antimicrobianas, há poucos estudos sobre sua eficácia contra patógenos que afetam as colônias, com a maioria dos estudos focando nas doenças de cria: loque americana, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, e cria giz, causada pelo fungo *Ascosphaera apis* (Simone-Finstrom et al., 2017).

Um estudo sobre a cria giz investigou o efeito da introdução de própolis na

alimentação das abelhas por meio de xarope. Embora a própolis não tenha sido capaz de evitar ou erradicar completamente a doença, os resultados mostraram uma redução significativa nos sinais clínicos da cria giz nas colônias suplementadas. Além disso, menos esporos do fungo causador da doença foram encontrados no mel produzido pelas colônias que receberam a suplementação de própolis. Esses achados sugerem que alimentar as abelhas com própolis pode ser comparável à administração de antibióticos orais para controlar a doença e prevenir seu agravamento. Embora não seja uma solução definitiva, a utilização de própolis na alimentação das abelhas pode representar uma abordagem promissora para reduzir os efeitos da cria giz e melhorar a saúde das colônias (Lindenfelser, 1968).

Uma preocupação significativa relacionada ao uso de própolis é a variação nas propriedades antimicrobianas desse composto. Essa variação ocorre devido às diferentes fontes vegetais e regiões geográficas onde as abelhas se encontram, resultando em própolis com composições químicas distintas. Essa diversidade pode levar a dosagens inadequadas, o que pode comprometer a microbiota benéfica presente no estômago das abelhas. Como resultado, as abelhas podem se tornar mais suscetíveis a outras doenças e, em casos extremos, isso pode até levar à morte da colônia (Tian et al., 2012).

Outra preocupação ao usar própolis como "remédio", tanto para o combate de doenças quanto para mitigar os efeitos subletais de agrotóxicos, é a presença de resíduos de defensivos agrícolas que podem ser encontrados como contaminantes da própolis coletada. Em várias regiões do mundo, foram encontrados resíduos de pesticidas e até mesmo antibióticos nos produtos das colmeias, como cera, pólen, mel e própolis (Simone-Finstrom, 2017).

Em estudos recentes, foi observado que as abelhas têm uma potencial capacidade para identificar a presença de agrotóxicos, pelo menos nos grãos de pólen. Observou-se que algumas abelhas fecham células com pólen contaminado armazenado com própolis e utilizam camadas mais espessas de própolis em células anteriormente contaminadas. A frequência desse comportamento e seu efeito subsequente sobre a saúde geral da colônia ainda não são totalmente compreendidos (Johnson, 2015).

Alguns experimentos que envolvem a administração de doses orais de própolis, em comparação com outros componentes químicos, demonstram que a própolis pode fortalecer não apenas o sistema imunológico, mas também as vias de desintoxicação para o desafio com patógenos (Johnson et al., 2012; Mao et al., 2013). Em todos os agrupamentos nesse experimento, foi observado que as abelhas em ambientes com própolis têm uma maior propensão a investir na produção de peptídeos antimicrobianos quando expostas a micróbios patogênicos ou compostos químicos, em comparação com abelhas de mesma idade em colônias sem própolis. Assim, o investimento individual em defesas imunológicas pode depender do contexto de investimento geral da colônia em seus sistemas de defesa (Simone- Finstrom, 2017). As abelhas têm enfrentado um declínio crescente em sua população, principalmente devido à exposição a vários estressores físicos, químicos e fisiológicos um assunto que será mais explorado no próximo item. Esses estressores, principalmente quando combinados, causam uma perturbação na homeostase do organismo, caracterizando o chamado estresse oxidativo (Spivak et al., 2011)

Esse fenômeno ocorre quando radicais de oxigênio são produzidos em quantidade maior do que o organismo é capaz de neutralizá-los com antioxidantes , levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) devido aos resíduos de degradação. O aumento nas concentrações de ERO causa danos oxidativos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, interferindo na funcionalidade das células, órgãos e de todo o organismo. Quando o organismo é gravemente afetado, isso pode levar à morte do indivíduo (Olgun et al., 2020).

Em situações normais, há um equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o processo antioxidante. No entanto, quando esse equilíbrio é perturbado, existem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos para prevenir os danos causados pelos ERO (Yan et al., 2012). As enzimas antioxidantes mais importantes nas abelhas incluem glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), enquanto os componentes não enzimáticos incluem glutathione, NAD(P)H, vitaminas C e E, albumina, ácido úrico e queratina (Olgun et al., 2020). A GST desempenha um papel crucial no estresse oxidativo, revertendo danos causados por inseticidas e distúrbios

no equilíbrio redox ou na produção de hidroperóxidos lipídicos. Tanto a vitelogenina quanto o hormônio juvenil também estão envolvidos no estresse oxidativo, onde a expectativa de vida e os níveis de estresse dependem dos níveis de hexamerinas (Hex) e vitelogenina (Vg), proteínas produzidas pelas glândulas das abelhas operárias e também depositada nos ovos pelas abelhas rainhas (Seehuus et al., 2006).

Além de sua função reprodutiva, a vitelogenina também atua como um antioxidante, retardando o envelhecimento e prolongando a vida útil, tanto das operárias quanto da rainha. Sua concentração está diretamente ligada à sobrevivência da abelha em situações de estresse oxidativo agudo, o que pode explicar a diferença de longevidade entre as castas. Por exemplo, os zangões são mais sensíveis ao estresse oxidativo devido aos níveis mais baixos de vitelogenina (Corona et al., 2007).

Os pesticidas são os principais desencadeadores de estresse oxidativo nas abelhas, podendo ser agravados por outros estressores, como más condições de desenvolvimento e alimentação, condições climáticas adversas e patologias (Olgun et al., 2020). Abelhas expostas a agrotóxicos podem apresentar alterações na produção das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e xantina oxidase (XOX), com um aumento significativo nos níveis de SOD e CAT em locais com alto uso de agrotóxicos (Chakrabarti et al., 2015). O sistema imunológico das abelhas é afetado pelo estresse oxidativo causado pelos agrotóxicos, influenciando a resposta do organismo a ameaças e sua sobrevivência (Olgun et al., 2020).

Num estudo, a exposição ao clorpirifós resultou em aumento da peroxidação lipídica, associada diretamente ao estresse e aos danos oxidativos no sistema nervoso (Rehman e Waliullah, 2012). O imidacloprido, inseticida utilizado na agricultura, pode reduzir os níveis de lipoforina na hemolinfa e prejudicar a produção de energia pelas mitocôndrias das abelhas (Nicodemo et al., 2014, 2018). Herbicidas também podem induzir o estresse oxidativo em abelhas, diminuindo a atividade de enzimas antioxidantes e alterando a expressão de genes relacionados aos antioxidantes (Williams, 2016).

1.5 Declínio populacional mundial das abelhas

A relação entre humanos e abelhas remonta a pelo menos 6.000 anos antes de Cristo, como evidenciado por arte rupestre encontrada em cavernas pela Europa e África, indicando uma interação rudimentar entre as duas espécies. Essa interação, embora tenha sido extrativista, proporcionou benefícios aos humanos, que coletavam principalmente mel das colônias, mas que também poderia resultar na morte dessas colônias. Por volta de 4400 anos antes de Cristo, os antigos egípcios desenvolveram técnicas de apicultura usando potes de argila, o que possibilitou a disseminação das abelhas pelo Mediterrâneo, marcando um dos primeiros exemplos de apicultura migratória rudimentar (Crane, 1999).

Com o progresso humano, a apicultura também evoluiu, com o desenvolvimento de novas técnicas e práticas de manejo que permitiram a coleta de recursos sem prejudicar as colônias. No entanto, com o aumento da população humana e o avanço da agricultura, novas ameaças surgiram para as abelhas em todo o mundo ao longo do tempo. Um dos principais desafios enfrentados pelas abelhas, e que tem despertado grande preocupação entre produtores e pesquisadores, é o declínio populacional observado em todo o mundo, especialmente nas últimas seis décadas. Múltiplos fatores têm sido apontados como contribuintes para esse declínio, sendo tema constante de discussão e pesquisa (Smith et al., 2013).

A perda contínua e o possível desaparecimento das abelhas representam uma preocupação global, uma vez que esses insetos desempenham um papel fundamental na polinização de diversas culturas agrícolas, sendo essenciais para a segurança alimentar (Corby-Harris et al., 2016). Múltiplas causas têm sido apontadas como fatores contribuintes para o declínio das populações de abelhas, incluindo doenças, parasitismo, fragilidade das rainhas, desnutrição, uso de pesticidas, perda e fragmentação de habitat, e fatores antrópicos (Freitas et al., 2016). Embora esses fatores sejam frequentemente estudados de forma isolada, eles interagem de maneira complexa, dificultando a determinação do impacto real de cada um deles (Corby-Harris et al., 2016).

A rápida expansão da importação de mel de outros países a preços abaixo do

mercado na década de 60, juntamente com a suspensão do apoio federal aos preços do mel nacional em 1996 e a interrupção das exportações dos Estados Unidos para o Canadá em 1987, houve uma diminuição no interesse dos produtores nessa atividade resultando na perda de 250.000 colônias por ano apenas na Califórnia (VanEngelsdorp e Meixner, 2010). Essa situação começou a mudar com a mudança de foco do mercado apícola nos Estados Unidos, onde o aluguel de colônias para a polinização de culturas agrícolas se tornou a principal atividade dos apicultores (Freitas et al., 2016).

No Brasil, a queda na população de abelhas pode ser observada após o período da Segunda Guerra Mundial, sendo principalmente atribuída à fragmentação e perda de habitat natural devido à rápida intensificação da atividade agrícola, especialmente nas plantações de soja e cana-de-açúcar, além do aumento da urbanização (Beringer et al., 2019). A diminuição das áreas de mata com diversidade florística, transformando paisagens naturais em vastos campos de monoculturas, combinada com as mudanças climáticas, afeta diretamente a disponibilidade de alimentos, abrigo e locais de nidificação, prejudicando tanto as abelhas manejadas quanto as selvagens (Döhler e Pina, 2017). O desmatamento e as monoculturas são as principais causas da desnutrição enfrentada pelas abelhas, resultando em distúrbios morfofisiológicos e comportamentais que afetam o desenvolvimento da colônia, reduzem a expectativa de vida das abelhas e, em situações extremas, levam ao declínio das populações (Pires et al., 2016).

O aumento da urbanização também se tornou uma preocupação, pois reduziu o espaço disponível para a formação de ninhos de abelhas, forçando uma maior introdução desses insetos aos centros urbanos. Nesses ambientes, as abelhas tornaram-se mais suscetíveis a estressores como escassez de água, baixa disponibilidade de alimentos e aumento da competição por recursos entre diferentes espécies (Hamblin et al., 2018).

Na cidade de Curitiba, Estado do Paraná, foi observada uma diminuição de 45% na diversidade de abelhas, passando de 112 espécies para 63 entre 1982 e 2015. Algumas espécies anteriormente consideradas abundantes agora são consideradas extintas na região. As abelhas eussociais, que nidificam no solo, foram particularmente

prejudicadas devido às alterações no solo decorrentes do aumento da pavimentação, construção de edifícios e mudanças na permeabilidade do solo (Cardoso e Gonçalves, 2018). Além disso, há o risco de acidentes envolvendo abelhas melíferas, devido aos estímulos mais intensos encontrados em ambientes urbanos, o que pode levar à eliminação de ninhos relatados às autoridades para garantir a segurança da população (Freitas et al., 2016).

A urbanização rural aproximou os produtores, impulsionando a popularização da apicultura como uma alternativa econômica viável para aumentar a renda, especialmente para os envolvidos na agricultura familiar. Porém ao se tornar uma fonte secundária de renda e uma atividade considerada de baixa manutenção em sua maioria, muitos produtores negligenciam o aprofundamento do conhecimento sobre as abelhas e o mercado de seus produtos (Arruda et al., 2011).

A falta de conhecimento técnico dos apicultores é uma questão que precisa ser enfrentada. Sem um desenvolvimento técnico adequado, a atividade permanece estagnada e defasada em comparação com outros países, destacando a importância da colaboração entre produtores e especialistas (Tassinari et al., 2013). A profissionalização da apicultura não apenas aumenta a produção e a rentabilidade dos apicultores, por meio da introdução de novas técnicas e aprimoramento no manejo das colônias, mas também permite uma identificação mais eficaz de problemas, como a instalação de apiários em locais inadequados, melhor tratamento contra doenças e uma relação mais sólida com os órgãos públicos relacionados ao setor (Camargo et al., 2014). As doenças também são uma grande ameaça, dessa forma, para controlá-las de forma eficaz, os apicultores devem estar familiarizados com as principais doenças e seus processos infecciosos, permitindo um diagnóstico precoce para evitar perdas nas colônias (Moritz et al., 2010).

A domesticação das abelhas é apontada como um fator significativo no declínio de suas populações. Na Europa, por exemplo, a alta densidade de manejo resultou em apenas 2% da população atual de abelhas sendo consideradas selvagens (Requier et al., 2020). Uma das preocupações relacionadas ao manejo é a introdução de diferentes espécies em diversas regiões do mundo. Esse intercâmbio provocou o alastramento de patógenos e parasitas, como a *Apis cerana* no norte da Austrália e a

Apis florea na África, além da introdução de várias subespécies na Ásia, que agora estão difundidas em todo o continente (Forsgren et al., 2015; Chanpanitkitchote et al., 2018).

O manejo intenso das abelhas resultou na perda da diversidade genética das espécies. Esse fenômeno começou provavelmente devido à pressão na seleção artificial focada no desempenho das rainhas, combinada com a baixa densidade de colônias em habitats fragmentados, com predomínio de apiários manejados na Europa (Panziera et al., 2022).

Nos últimos anos, o amplo uso da apicultura migratória, do comércio derainhas e da reprodução fora de áreas nativas têm levado a muitos eventos de hibridização, mediados diretamente ou indiretamente pelo homem. Embora essa mistura possa aumentar a diversidade a curto prazo, também pode resultar nahomogeneização em grande escala e, conseqüentemente, na diminuição da diversidade genética, levando à perda de adaptações locais (Panziera et al., 2022). Essas mudanças genéticas, às vezes intencionais em populações manejadas, podem afetar significativamente a aptidão das populações locais selvagens à medida que rainhas selvagens e zangões manejados se reproduzem (Neumann e Blacquièrre, 2017). Por outro lado, as abelhas melíferas da Floresta de Arnot, localizada no estado de Nova York, não apresentaram uma grande perda de variação de DNA nuclear nas últimas décadas, apesar da seleção natural, embora tenha sido observada a perda de algumas linhagens maternas (Mikheyev et al., 2015).

Contudo, o impacto dos agrotóxicos é um dos aspectos mais debatidos e pesquisados no contexto do declínio das abelhas. Durante a fase operária, quando as abelhas coletam recursos, elas estão mais expostas aos diferentes tipos de agrotóxicos, o que pode levar à intoxicação dos indivíduos que realizam atividades dentro da colônia ao consumirem alimentos contaminados trazidos pelas forrageiras (Pham-Delègue et al., 2002).

Embora a criação de culturas transgênicas tenha sido inicialmente vista como uma vantagem para a apicultura, pois reduziria a necessidade de pesticidas ao tornar as plantas geneticamente mais resistentes aos seus agressores, posteriormente foi observado que essas plantas se tornaram resistentes até mesmo

aos herbicidas anteriormente utilizados, o que resultou no aumento do uso desses produtos. Isso não apenas contaminou os recursos alimentares das abelhas, mas também teve um impacto negativo na diversidade floral, já que as plantas daninhas, que antes forneciam recursos para as abelhas, foram erradicadas (Johnson et al., 2010).

A exposição contínua aos agrotóxicos, mesmo em baixas concentrações, e o acúmulo de resíduos nas reservas de alimento afetam o sistema nervoso das abelhas, causando problemas cognitivos, como aguçamento do olfato, dificuldade nos voos e desorientação. Em casos mais graves, pode ocorrer o colapso fisiológico dos indivíduos, levando ao definhamento das colônias, pois as abelhas mais jovens são obrigadas a iniciar a coleta de alimentos mais cedo e sofrem os mesmos efeitos que suas predecessoras (Imperatriz-Fonseca et al., 2010; Zhang e Nieh, 2015).

O impacto dos fungicidas, uma categoria de agrotóxico, tem sido uma crescente preocupação na comunidade científica em relação às abelhas. Além dos agrotóxicos convencionais, os fungicidas também podem representar uma ameaça significativa para a saúde desses insetos (DeGrandi-Hoffman, 2016). A exposição a esses produtos químicos pode resultar em efeitos adversos, incluindo danos ao sistema imunológico, comprometimento do desenvolvimento larval e redução da capacidade de reprodução das abelhas. Portanto, compreender e mitigar os efeitos dos fungicidas é crucial para proteger as populações de abelhas e garantir a polinização adequada de plantas cultivadas e ecossistemas naturais.

1.6 Impacto dos fungicidas nas abelhas

Com o aumento das doenças fúngicas afetando diversas culturas agrícolas, o uso de fungicidas tornou-se vital para garantir a segurança alimentar global. Culturas como grãos, sementes oleaginosas, frutas e vegetais dependem desses produtos químicos para controle de doenças fúngicas. Por essa razão, os fungicidas já representam 35% do mercado mundial de agrotóxicos, com previsão de aumento favorável no futuro (Zubrod et al., 2019).

Os fungicidas frequentemente não recebem a devida atenção, resultando em

seu uso excessivo. Podem ser aplicados até dez vezes durante uma temporada, o que aumenta a probabilidade de as abelhas que coletam recursos encontrarem fungicidas em vez de inseticidas no campo. Além disso, por serem considerados mais seguros para insetos, os fungicidas podem ser pulverizados mesmo quando as culturas estão em fase de floração, momento em que há um aumento significativo de insetos nas flores (Favaro et al., 2019). Como resultado, resíduos desses produtos passaram a ser comumente encontrados nas abelhas e nos produtos apícolas, expondo-as a riscos potenciais de saúde (Rondeau e Raine, 2022).

Nos últimos vinte anos, houve um foco crescente em pesquisas sobre os efeitos negativos dos fungicidas, incluindo aumento da mortalidade de crias e adultos em abelhas sociais e solitárias, perturbações no comportamento alimentar, dificuldade no reconhecimento de ninhos, redução na viabilidade espermática de zangões e aumento da suscetibilidade a patógenos (Rondeau e Raine, 2022). Existem questionamentos de outros pesquisadores se as exposições demonstradas nesses estudos realmente refletem os cenários reais de campo, pois é crucial considerar a magnitude, duração e frequência da exposição, bem como as diferentes rotas de exposição em diferentes espécies de abelhas (Cutler et al., 2014; Franklin e Raine, 2019).

A exposição das abelhas aos fungicidas pode ocorrer de várias maneiras, incluindo via oral, contato direto ou inalação de partículas volatilizadas no ar. Isso está intimamente relacionado ao método e ao momento da aplicação do agrotóxico, aos outros produtos químicos com os quais pode estar associado, às suas propriedades físico-químicas e ao tempo que permanece no ambiente (Boyle et al., 2019). Os fungicidas podem ser aplicados de várias maneiras, como pulverização foliar, encharcamento do solo, grânulos incorporados no solo ou como cobertura de sementes (Zubrod et al., 2019). Além disso, a correlação entre fungicidas e outros agrotóxicos como inseticidas e herbicidas, é comum, resultando em uma alta exposição combinada a múltiplos contaminantes (Zubrod et al., 2019).

A pulverização é o principal método de aplicação dos fungicidas e está intimamente ligada à exposição das abelhas a esses produtos. Isso ocorre porque as gotículas pulverizadas podem se dispersar pelo vento, atingindo diretamente as abelhas que estão coletando recursos ou voando próximo às culturas tratadas. Além

disso, a pulverização é uma grande fonte de contaminação dos recursos de forrageamento e de nidificação, como flores selvagens, solo e água (Sanchez-Bayo e Goka, 2016).

Nota-se que o uso de fungicidas é especialmente comum em culturas arbóreas e de videiras, aumentando ainda mais as chances e a distância da deriva, já que nessas culturas geralmente são utilizados bicos de pulverização para alcançar alturas maiores (Zubrod et al., 2019).

A maioria dos fungicidas aplicados no tratamento de sementes possui propriedades sistêmicas, sendo altamente solúveis em água. Eles são absorvidos pela planta e translocados através do caule e folhas para o pólen, néctar e água de gutação durante o crescimento da planta. Os fungicidas aplicados nas sementes podem persistir em baixas concentrações nos tecidos vegetais por vários meses e no solo por muitos anos (Sanchez-Bayo e Goka, 2016). Os resíduos desses fungicidas podem contaminar as abelhas por meio de partículas de poeira, resultantes do atrito das sementes revestidas com fungicidas nas máquinas durante o plantio (Boyle et al., 2019).

Além disso, plantas selvagens próximas às culturas tratadas podem ser contaminadas pela dispersão no solo desses fungicidas sistêmicos, através do fluxo lateral de água ou da pulverização excessiva (Sanchez-Bayo e Goka, 2016). Resíduos de fungicidas podem ser encontrados em todos os componentes da colmeia, tanto na estrutura quanto no alimento. As larvas passam por todo o seu desenvolvimento em um ambiente contaminado, enquanto as abelhas adultas, que passam a maior parte de suas vidas habitando ninhos feitos de cera possivelmente contaminada, também são afetadas (Boyle et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, o pólen e o néctar são as principais fontes de contaminação por fungicidas. Após a aplicação dos sprays, os níveis e a biodisponibilidade dos fungicidas diminuem com a secagem, mas os resíduos ainda podem apresentar níveis moderados ou inaceitáveis de risco por vários dias (Cutler et al., 2014). Esses resíduos, ao serem coletados e levados para as colmeias, permanecem por um longo período nas reservas de alimento, sendo posteriormente consumidos pelas nutrizes, que por sua vez alimentam a cria e a rainha (Rondeau e

Raine, 2022).

A água desempenha um papel crucial na colmeia, sendo coletada de várias fontes, como lagoas, folhas úmidas, orvalho e água superficial no solo. Além de ser essencial para a termorregulação, o preparo de alimentos e o metabolismo individual das abelhas (Cutler et al., 2014), ela pode estar contaminada por resíduos de fungicidas provenientes da chuva, da pulverização e do escoamento em solos contaminados (Zubrod et al., 2019).

Nas áreas próximas a plantações de milho, foram encontradas poças de água com concentrações relativamente baixas de agrotóxicos. Testes realizados em laboratório confirmaram que essas doses subletais têm efeitos prejudiciais tanto em nível individual quanto em nível de colônia. Portanto, a água se torna uma fonte subestimada de contaminação, cujo risco muitas vezes não é considerado. Essa contaminação não afeta apenas as abelhas, mas também outros polinizadores e até mesmo pequenos mamíferos (Samson-Robert et al., 2014).

A cera também é uma preocupação significativa, pois é utilizada na construção das células onde ocorre o armazenamento de alimento e a criação de descendentes (Boyle et al., 2019). Sua contaminação geralmente ocorre pelo armazenamento de pólen contaminado e néctar contendo resquícios de fungicidas e outros pesticidas dentro dos favos (Daniele et al., 2018).

As abelhas solitárias selvagens, assim como as abelhas sociais, estão expostas a fontes de contaminação semelhantes, como pólen, néctar e até mesmo partículas de poeira no ar (Boyle et al., 2019). No entanto, as abelhas solitárias diferem-se ao construir seus ninhos em vegetações ou no solo, sendo essa a principal fonte de contaminação tanto para as abelhas adultas quanto para as larvas, que utilizam materiais como folhas, madeira e lama para nidificar (Sgolastra et al., 2019). A exposição geralmente ocorre por via oral, com as abelhas adultas sendo expostas durante a busca por alimentos ou enquanto descansam em vegetações ou flores, e as larvas sendo afetadas quando resíduos de fungicidas lixiviam das folhas ou do solo, contaminando seu alimento (Rondeau e Raine, 2022).

Em diversos países ao redor do mundo, foram detectados diversos princípios ativos de fungicidas nos produtos das colmeias, como a Trifloxistrobina e o

Protioconazol, que pertencem aos grupos químicos das estrobilurinas e das triazolintionas, encontrados em amostras de mel, pólen e no pão de abelha (Rondeau e Raine, 2022).

No Brasil, com o aumento da agricultura, houve um estímulo para o desenvolvimento de fungicidas mais eficazes no controle de fungos, resultando na formulação de produtos comerciais com três princípios ativos. Um exemplo é o fungicida Fox® Xpro, contendo Trifloxistrobina, Protioconazol e Bixafem, amplamente utilizado em culturas como algodão, feijão, girassol, milho, soja e trigo (Agrofit, 2023).

1.6.1 Bixafem

O bixafem é um fungicida que pertence ao grupo químico das carboxamidas, e sua ação principal ocorre na cadeia respiratória mitocondrial dos fungos, inibindo a enzima succinato desidrogenase (SDHI). Essa enzima é responsável por transferir elétrons no complexo II das mitocôndrias dos fungos, essencial para o processo de respiração celular, ciclo do ácido cítrico e produção de ATP, que é a principal fonte de energia das células (Oliver e Hewitt, 2014). Ao inibir essa enzima, ocorre uma interrupção no transporte eficiente de elétrons, levando a uma redução na produção de ATP e, conseqüentemente, à diminuição das atividades vitais das células fúngicas, resultando eventualmente em sua morte (Frac, 2019).

Este fungicida faz parte da nova geração de princípios ativos e possui efeito mesostêmico e sistêmico, sendo amplamente utilizado devido à sua eficácia no controle de doenças fúngicas em diversas culturas agrícolas, como trigo e cevada (Oliver e Hewitt, 2014). Seus efeitos sobre insetos ainda são pouco conhecidos, mas estudos realizados com outros fungicidas do mesmo grupo químico revelaram impactos negativos, incluindo diminuição na expectativa de vida das abelhas, comprometimento da mobilidade das asas durante o voo e efeito sinérgico quando associado a outros pesticidas (Simon-Delso et al., 2018; Liao et al., 2019; Tsvetkov et al., 2017).

1.6.2 Trifloxistrobina

A trifloxistrobina é classificada como uma estrobilurina e tem como principal função inibir a quinona externa (IQe), bloqueando a coenzima Q-citocromo c-redutase, que é crucial para transferir elétrons no complexo III da cadeia respiratória mitocondrial. Isso interfere na produção de ATP, que é essencial para as funções vitais das células fúngicas. Ao impedir essa transferência de elétrons, as células fúngicas não conseguem gerar energia suficiente, levando à sua deterioração e eventual morte, um processo similar ao observado com o Bixafem (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017).

Esse fungicida é comumente utilizado de forma preventiva, sendo aplicado antes do aparecimento de infecções, e é eficaz no controle de uma variedade de doenças fúngicas em culturas como frutas, vegetais e cereais, especialmente aquelas que afetam folhas e frutos (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017).

Existem poucos estudos sobre os efeitos da trifloxistrobina em abelhas melíferas. Silva-neto et al. (2018) constataram que a trifloxistrobina aumenta significativamente a taxa de mortalidade e tem efeitos repelentes nas abelhas nativas *Melipona quadrifasciata*, que desempenham um papel crucial na polinização de culturas que requerem a agitação das flores para liberar o pólen. Outros princípios ativos do mesmo grupo químico demonstraram ser prejudiciais para abelhas melíferas, causando danos ao intestino médio e inibindo a cadeia respiratória mitocondrial, assim como nos fungos (Tadei et al., 2019).

1.6.3 Protioconazol

O protioconazol é um fungicida pertencente ao grupo dos triazóis, reconhecidos por interferir na formação da membrana celular dos fungos. Ele atua inibindo a esteróide, um componente crucial para a estrutura celular dos fungos. Existem dois subgrupos de inibidores: aqueles que afetam a metilação de C-14 e os que atuam na D-isomerase e D-redutase. Quando as partículas do fungicida entram em contato com as células dos fungos, ocorre o acúmulo de esteróides, inibindo a conversão de lanosterol para 24-metilenodihidrolanoesterol e a subsequente desmetilação na

posição C-13. Isso resulta na inibição do citocromo P-450 e na formação de compostos metilados em vez de ergosterol e outros esteróides. Esse desequilíbrio de lipídios nas membranas celulares leva à inibição de fosfolipídios, acúmulo de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, à morte dos fungos (Zambolim, 2007; Reis et al., 2017).

Esse fungicida tem como objetivo proteger as plantas e erradicar ameaças fúngicas, impedindo a germinação dos esporos, o desenvolvimento do tubo germinativo, bem como o crescimento micelial e de haustórios (Frac, 2019). Desde sua liberação no mercado em 2004, o protioconazol tem sido amplamente utilizado para combater uma variedade de doenças conhecidas das plantações, como ferrugem, oídio e manchas foliares, em culturas importantes como soja, cereais e algodão (Frac, 2019).

Embora haja poucos estudos específicos sobre os efeitos do protioconazol em abelhas, pesquisas envolvendo outros fungicidas do mesmo grupo químico sugerem que efeitos negativos, como distúrbios comportamentais e diminuição da resistência a patógenos, podem ser observados em abelhas contaminadas com esses fungicidas (Fisher et al., 2017). Portanto, é crucial realizar mais estudos sobre os efeitos desses fungicidas, a fim de compreender melhor suas conseqüências e ajudar na proteção das abelhas.

2. Objetivo

Através deste estudo, buscou-se comparar o efeito nutricional em abelhas recém-emergidas de colônias que receberam suplementação alimentar com aquelas de colônias que passaram por privação alimentar, ao serem alimentadas com proteína contaminada com fungicida de ação tripla. Além disso, procurou-se observar se a suplementação com própolis na alimentação energética poderia reduzir ou evitar os danos causados pela alimentação contaminada. Essas análises foram realizadas medindo a expressão de genes importantes para a saúde das abelhas, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Referências

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current biology**, v. 19, n. 11, p. 915-918, 2009.

ALVES, L. H.; CASSINO, Paulo C. R.; PREZOTO, F. Efeito dos fatores abióticos sobre a atividade forrageadora de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 em inflorescências de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, p. 405-409, 2015.

AMDAM, G.; OMHOLT, S. W. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. **Journal of theoretical biology**, v. 223, n.4, p. 451-464, 2003.

AMDAM, G.; OMHOLT, S. W. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. **Journal of theoretical biology**, v. 216, n. 2, p. 209-228, 2002.

AMENT, S. A.; WANG, Y.; ROBINSON, G. E. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 5, p. 566-576, 2010.

ANDERSON, L. M.; DIETZ, A. Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing. **Apidologie**, v. 7, n. 1, p. 67-84, 1976.

ARMBRUSTER, W. S. The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 8, p. 1149-1160, 1984.

ARRUDA, J. B. F.; BOTELHO, B. D.; CARVALHO, T. C. Diagnóstico da cadeia

produtiva da apicultura: um estudo de caso. 2011.

BARKER, R. J. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. **The Journal of Nutrition**, v. 107, n. 10, p. 1859-1862, 1977.

BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. F. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 2019.

BORBA, R. S.; KLYCZEK, K.; MOGEN, K. L.; SIVAK, M. Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 22, p. 3689-3699, 2015.

BORBA, R. S. Constitutive and therapeutic benefits of plant resins and a propolis envelope to honey bee, *Apis mellifera* L., immunity and health. 2015. **Tese de Doutorado**. University of Minnesota.

BOYLE, N. K.; PITTS-SINGER, T. L.; ABBOTT, J.; ALIX, A.; COX-FOSTER, D. L.; HINAREJOS, S.; LEHMANN, D. M.; MORANDIN, L.; O'NEILL, B.; RAINE, N. E.; SINGH, R.; TROMPSON, H. M.; WILLIAMS, N. M.; STEEGER, T. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019.

BRODSCHNEIDER, R.; HARASSNIGG, N.; VOLLMANN, J.; PETZ, M.; RIESSBERGER-GALLÉ, U.; CRAILSHEIM, K. Liquid nutrition within a honeybee colony—who feeds. **Apidologie**, v. 38, p. 492, 2007.

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

BYATT, M. A.; CHAPMAN, N. C.; LATTY, T.; OLDROYD, B. P. The genetic consequences of the anthropogenic movement of social bees. **Insectes Sociaux**, v. 63, p. 15-24, 2016.

CALFEE, E.; AGRA, M. N.; PALACIO, M. A.; RAMIREZ, S. R.; COOP, G. Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas. **PLoS genetics**, v. 16, n. 10, p. e1009038, 2020.

CAMARGO, S. C.; GARCIA, R. C.; FEIDEN, A.; DE VASCONCELOS, E. S.; PIRES, B. G.; HARTLEBEN, A. M.; DE MORAES, F. J.; DE OLOIVEIRA, L.; GIASSEN. J.; MITTANCK, E. S.; GREMASCHI, J. R.; PEREIRA, D. J. Implementation of a geographic information system (GIS) for the planning of beekeeping in the west region of Paraná. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 955-971, 2014.

CANTRILL, R. C.; HEPBURN, H. R.; WARNER, S. J. Changes in lipid composition during sealed brood development of African worker honeybees. 1981.

CARDOSO, M. C.; GONÇALVES, R. B. Reduction by half: the impact on bees of 34 years of urbanization. **Urban ecosystems**, v. 21, n. 5, p.

CARROLL M.; BROWN, N.; GOODALL, C.; DOWNS, A.; SHEENAN, T. H.; ANDERSON, K. E. Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175933, 2017.

CASTAGNINO, G. L. B.; PINTO, L. F. B.; CARNEIRO, M. R. L. Correlação da infestação de *Varroa destructor* sobre o comportamento higiênico de abelhas *Apis mellifera*. **Archivos de zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 549-554, 2016.

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, p. 107-129, 2015.

CHANTAWANNAKUL, P.; RAMSEY, S. The overview of honey bee diversity and health status in Asia. **In: Asian beekeeping in the 21st century**, p. 1-39, 2018.

CHMIEL, J. A.; DAISLEY, B. A.; PITEK, A. P.; THOMPSON, G. J.; REID, G. Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: a role for probiotics as mediators of environmental stress. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 22, 2020.

COMPER, J. R.; EBERL, H. J. Mathematical modelling of population and food storage dynamics in a honey bee colony infected with *Nosema ceranae*. **Heliyon**, v. 6, n. 8, 2020.

CORBY-HARRIS, V.; SNYDER, L.; MEADOR, C. A. D.; NALDE, R.; MOTT, B.; ANDERSIN, K. E. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) resistance to *Nosema*. **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 2, p. 537-543, 2016.

CORONA, M.; VELARDE, R. A.; REMOLINA, R.; MORAN-LAUTER, A.; WANG, Y.; HUGHES, K. A.; ROBISON, G. E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7128-7133, 2007.

CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, L. H. W.; HRASSNIGG, N.; 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**, v. 38, n. 6, p. 409-419, 1992.

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

CULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; SATANLEY, D.A. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **PloS one**, v. 14, n. 12, p. e0225743, 2019.

CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D.; DREXLER, D. M. Honey bees, neonicotinoids and bee incident reports: the Canadian situation. **Pest management science**, v. 70, n. 5, p. 779-783, 2014.

DANIELE, G., GIROUD, B., JABOT, C. VULLIET, E. Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 6145-6153, 2018.

DE FREITAS, P. V. D. X, RIBEIRO, F. M., DE ALMEIDA, E. M., ZANATA, R. A., ALVEWS, J. J. L., OLIVEIRA, V. F., FAQUINELLO, P. Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **Pubvet**, v. 11, p. 1-102, 2016.

DE MELO E SILVA-NETO, C.; CHAVES-RIBEIRO, A. C.; GOMES, F. L.; NEVES, J. G.; DE MELO, A. P. C.; CALIL, F. N.; NASCIMENTO, A. R.; FRANCESCHINELLI, E. V. Interaction between biological and chemistry fungicides and tomato pollinators. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 12, n. 2, p. 425-435, 2018.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; HAGLER, J. The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. **Insectes sociaux**, v. 47, p. 302-306, 2000.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CORBY-HARRIS, V.; DEJONG, E. W; CHAMBERS M, HIDALGO, G. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide

Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, v. 48, p. 340-352, 2017.

DÖHLER, T. L.; DA COSTA PINA, W. Abelhas (*Hymenoptera: Apoidea*) visitantes florais do sabiá (*Mimosa Caesalpiniiifolia Benth.*) em Teixeira de Freitas, Bahia, Brasil. **Scientia Plena**, v. 13, n. 8, 2017.

DUBOVSKIY, I. M., KRYUKOVA, N. A., GLUPOV, V. V., RATCLIFFE, N. A. Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, n. 1, p. 229-246, 2016.

FAVARO, R., BAUER, L. M., D'AMBROSIO, L., BUCHER, E., ANGELI, S. Botanical origin of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees during and after apple bloom. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 458-569, 2019.

FISHER, A.; CARVALHO, C. U.; OLIVEIRA, C.; RIBEIRO, B.; OLIVEIRA, J.; RANGEL, E. Synergistic effects of almond protective fungicides on the survival of bee forager (*Hymenoptera: Apidae*). **Journal of Economic Entomology**, 110, 2017, pp. 802-808.

FORSGREN, E., WEI, S., GUILING, D., ZHIGUANG, L., TRAN, T. V., TANG, P. T., TRUONG, T. A., DINH, T. Q., FRIES, I. Preliminary observations on possible pathogen spill-over from *Apis mellifera* to *Apis cerana*. **Apidologie**, v. 46, p. 265-275, 2015.

FRAC. Informações sobre triazóis, estrobilurinas e carboxamidas em ferrugem da soja. 3 p. (Informativo 01/2019). Disponível em: <<https://www.fracbr.org/soja>>.

FRANKLIN, E. L.; RAINE, N. E. Moving beyond honeybee-centric pesticide risk assessments to protect all pollinators. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 10, p. 1373-1375, 2019.

FREE, J. B. The behaviour of honeybee foragers when their colonies are fed sugar syrup. **Journal of apicultural research**, v. 4, n. 2, p. 85-88, 1965.

FRIAS, B. E. D.; BARBOSA, C. D.; LOURENÇO, A. P. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. **Apidologie**, v. 47, p. 15-25, 2016.

GROOT, A. P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). 1953.

HAMBLIN, A. L., YOUNGSTEADT, E., FRANK, S. D. Wild bee abundance declines with urban warming, regardless of floral density. **Urban Ecosystems**, v. 21, p. 419-428, 2018.

HANSER, G.; REMBOLD, H. Analytische und histologische Untersuchungen der Kopf- und Thoraxdrüsen bei der Honigbiene *Apis mellifica*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 19, n. 10, p. 938-943, 1964.

HAYDAK, M. H. Propolis. **Report Iowa State Apiarist**, p. 74-87, 1953.

HAYDAK, M. H. Age of nurse bees and brood rearing. **Journal of Apicultural Research**, v. 2, n. 2, p. 101-103, 1963.

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

HERBERT JR, Elton W., SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 1978.

HERBERT JR, Elton W., SHIMANUKI, H. Effect of fat soluble vitamins on the brood rearing capabilities of honey bees fed a synthetic diet. **Annals of the Entomological**

Society of America, v. 71, n. 5, p. 689-691, 1978.

HERBERT JR, Elton W., SHIMANUKI, H., SHASHA, B. S. Brood rearing and food consumption by honeybee colonies fed pollen substitutes supplemented with starch-encapsulated pollen extracts. **Journal of Apicultural Research**, v. 19, n. 2, p. 115-118, 1980.

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**, v. 25, n. 4, p. 683-694, 2021.

HRASSNIGG, N., BRODSCHNEIDER, R., FLEISCHMANN, P. H., CRAILSHEIM, K. Unlike nectar foragers, honeybee drones (*Apis mellifera*) are not able to utilize starch as fuel for flight. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 547-557, 2005.

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

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

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 59-62, 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., GONÇALVES, L. S., FRANCOY, T. M. NUNES-SILVA, P. O desaparecimento das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização. **Doc. (Embrapa Semi-Árido. Online)**, v. 249, p. 210-233, 2012.

JACHIMOWICZ, T.; EL SHERBINY, G. Zur problematik der verwendung von invertzucker für die bienenfütterung. **Apidologie**, v. 6, n. 2, p. 121-143, 1975.

JEON, J., MOON, K., KIM, Y., KIM, Y. H. Reference gene selection for qRT-PCR analysis of season-and tissue-specific gene expression profiles in the honey bee *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13935, 2020.

JOHNSON, B. R. A self-organizing model for task allocation via frequent task quitting and random walks in the honeybee. **The American Naturalist**, v. 174, n. 4, p. 537-547, 2009.

JOHNSON, B. R. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. Proceedings of the Royal Society of London. **Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1511, p. 147-152, 2003.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 64, p. 305-316, 2010.

JOHNSON, R. M., MAO, W., POLLOCK, H. S., NIU, G., SCHULER, M. A., BERENBAUM, M. R. Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31051, 2012.

JOHNSON, R. M., MARION, D. E., CHRISTOPHER, A. M., MARYANN, F. Pesticides and honey bee toxicity–USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

JOHNSON, Reed M. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 415-434, 2015.

JONES, J. C.; OLDROYD, B. P. Nest thermoregulation in social insects. **Advances in insect physiology**, v. 33, p. 153-191, 2006.

KERR, W. E., LAIDLAW JR, Harry H. General genetics of bees. **Advances in genetics**, v. 8, p. 109-153, 1956.

KLEINSCHMIDT, G. J., KONDOS, A. C. Influence of crude protein levels on colony production in relation to the pollen nutrition of *Apis mellifera*, 1976.

KUMAZAWA, S., NAKAMURA, J., MURASE, M., MIYAGAWA, M., AHN, M. R., FUKUMOTO, S. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. **Naturwissenschaften**, v. 95, p. 781-786, 2008.

LAPIDGE, K. L., OLDROYD, B. P., SPIVAK, M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 565- 568, 2002.

LARSEN, A., REYNALDI, F. V., GUZMÁN-NOVOA, E. Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 10, n. 3, p. 705-728, 2019.

LIAO, L., WU W. Y., DAD, A., BERENBAUM, M. R. Fungicide suppression of flight performance in the honeybee (*Apis mellifera*) and its amelioration by quercetin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1917, p. 20192041, 2019.

LINDENFELSER, L. A. In vivo activity of propolis against *Bacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 12, n. 1, p. 129-131, 1968.

LING, D., SALVATERRA, P. M. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17762, 2011.

LINKSVAYER, T. A., FONDRK, M. K.; PAGE JR, R. E. Honeybee social regulatory networks are shaped by colony-level selection. **The American Naturalist**, v. 173, n. 3, p. E99-E107, 2009.

LOURENÇO, A. P., GUIDUGLI-LAZZARINI, K. R., FREITAS, F. C., BITONDI, M. M., SIMÕES, Z. L. Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 5, p. 474-482, 2013.

MAO, W., SCHULER, M. A., BERENBAUM, M. R. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 8842-8846, 2013.

MARCELINO, J.; BRAESE, C.; CHRISTMON, K.; EVANS, J. D.; GILLIGAN, T.; GIRAY, T.; NEARMAN, A.; NIÑO, E.; ROSE, R.; SHEPPARD, W. S.; VANENGELDORP, D.; ELLIS, J. History, benefits, risks, and mitigation strategies. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 850600, 2022.

MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S80-S95, 2010.

MEYER, W.; ULRICH, W. 'Propolis bees' and their activities. **Bee world**, v. 37, n. 2, p. 25-36, 1956.

MIKHEYEV, A. S., TIN, M. M., ARORA, J. SEELEY, T. D. Museum samples reveal rapid evolution by wild honey bees exposed to a novel parasite. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

MILOJEVIC, B. D. A new interpretation of the social life of the honey bee. **Bee World**, v. 21, n. 4, p. 39-41, 1940.

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S. Efeito de diferentes regiões climáticas brasileiras e de tipos raciais de abelhas *Apis mellifera* na dinâmica de populações do ácaro *Varroa jacobsoni*. 1988.

MORITZ, R. F., DE MIRANDA, J., FRIES, I., LE CONTE, Y., NEUMANN, P., PAXTON, R. J. Research strategies to improve honeybee health in Europe. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 227-242, 2010.

MURPHY K, T. RAVERS P, WALPORT M. Janeway's Immunobiology. 9na ed. **London and New York: Garland Science Ed**; 2017.

NEUMANN, P.; BLACQUIÈRE, T. The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. **Evolutionary applications**, v. 10, n. 3, p. 226-230, 2017.

NICODEMO, D., MAIOLI, M.A., MEDEIROS, H. C., GUELFI, M., BALIEIRA, K. V., DE JONG, D. MINGATTO, F. E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2070-2075, 2014.

NICODEMO, D., DE JONG, D., REIS, L. G., ALMEIDA, J. M. V. D., SANTOS, A. A. D., LISBOA, L. A. M. Transgenic corn decreased total and key storage and lipid transport protein levels in honey bee hemolymph while seed treatment with imidacloprid reduced lipophorin levels. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 321-328, 2018.

NICOLSON, S. W.; HUMAN, H. Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). **Apidologie**, v. 44, p. 144-152, 2013.

OLGUN, T.; D., Miray; ÖZSOY, N. Pesticide and pathogen induced oxidative stress in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Mellifera**, v. 20, n. 2, p. 32-52, 2020.

PAGE JR, Robert E.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

PANZIERA, D.; REQUIER, F.; CHANTAWANNAKUL, P.; PIRK, C. W.; BLACQUIÉRE, T. The diversity declines in wild and managed honey bee populations urges for an integrated conservation approach. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 767950, 2022.

PATEL, V.; PAULI, N.; BIGGS, E.; BARBOUR, L.; BORUFF, B. Why bees are critical for achieving sustainable development. **Ambio**, v. 50, p. 49-59, 2021.

PHAM-DELÈGUE, M., H., DECOURTYE, A., KAISER, L., DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v. 33, n. 5, p. 425-432, 2002.

PESO, M.; EVEN, N.; SOVIK, E.; NAEGER, N. L.; ROBINSON, G. E.; BARRON, A. B. Physiology of reproductive worker honey bees (*Apis mellifera*): insights for the development of the worker caste. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 147-158, 2016.

PIRES, C. S. S.; PREIRA, F. F. M.; LOPES, M. T. D. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 422-442, 2016.

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, p. 345-353, 2010.

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.

PRATT, St. C. Condition-dependent timing of comb construction by honeybee colonies: how do workers know when to start building? **Animal behaviour**, v. 56, n. 3, p. 603-610, 1998.

REHMAN, S.; WALIULLAH, M. I. S. Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 4, n. 1, p. 30-36, 2012.

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.

REQUIER, F., PAILLET, Y., LAROCHE, F. RUTSCHMANN, B., ZHANG, J., LOMBARDI, F., STEFFAN-DEWENTER, I. Contribution of European forests to safeguard wild honeybee populations. **Conservation letters**, v. 13, n. 2, p. e12693, 2020.

RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022.

RORTAIS, A., ARNOLD, G., HALM, M. P., TOUFFET-BRIENS, F. Modes of Honey bees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated

pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71-83, 2005.

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

SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; CABONI, M. F.; BOGDAVOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. D. Quality and standardisation of royal jelly. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SALLES, H.C.; CRUZ-LANDIM, C. Efeito do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento da glândula mandibular em pupas de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol.64, pp.691-695, 2004.

SAMSON-ROBERT, O.; LABRIE, G.; CHAGNON, M.; FOURNIER, V. Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e108443, 2014.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of pesticides on honey bees. **Beekeeping and bee conservation-advances in research**, v. 4, p. 77-97, 2016.

SCHLÜNS, H.; CROZIER, R. H. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. **Insect molecular biology**, v. 16, n. 6, p. 753-759, 2007.

SCHMICKL, T.; CRAILSHEIM, K. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. **Apidologie**, v. 35, n. 3, p. 249-263, 2004.

SCHMIDT, J. O.; HANNA, A. Chemical nature of phagostimulants in pollen attractive

to honeybees. *Journal of Insect Behavior*, v. 19, n. 4, p. 521-532, 2006.

SEEHUUS, S. C.; NORBERG, K.; GIMSA, U.; KREKLING, T.; AMDAM, G. V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 4, p. 962-967, 2006.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 11, p. 287-293, 1982.

SEELEY, T. D. Decision making in superorganisms: How collective wisdom arises from the poorly informed masses. 2001.

SEELEY, T. D. The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies. **Harvard University Press**, 2009.

SILVEIRA, T. A. Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2012.

SIMON-DELISO, N.; SAN 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, n. 1, p. 7241, 2018.

SIMONE-FINSTROM, M.; BROBA, R. S.; WILSON, M.; SPIVAK, M. Propolis counteracts some threats to honey bee health. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 46, 2017.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295- 311, 2010.

SIMONE, M.; EVANS, J. D.; SPIVAK, M. Resin collection and social immunity in honey bees. **Evolution**, v. 63, n. 11, p. 3016-3022, 2009.

SMITH, C. R.; TOTH, A. L.; SIAREZ, A. V.; ROBINSON, G. E. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 735-748, 2008.

SMITH, K. M.; LOH, E. H.; ROSTAL, M. K.; ZAMBRANA-TORRELIO, C. M.; MENDIOLA, L.; DASZAK, P. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. **EcoHealth**, v. 10, p. 434-445, 2013.

SPIVAK, M.; MASTERMAN, R.; ROSS, R.; MESCE, K. A. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. **Journal of neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 341-354, 2003.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. **Apidologie**, v. 29, n. 3, p. 291-302, 1998.

SPIVAK, M.; MADER, E.; VAUGHAN, M.; EULISS JR. N. H. The plight of the bees. 2011.

STANDIFER, L. N. Supplemental feeding of honey bee colonies. Department of Agriculture, **Science and Education Administration**, 1978.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect science**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2008.

SVOBODA, J. A.; HERBERT JR, E. W.; THOMPSON, M. J.; FELDLAUFER, M. F. Selective sterol transfer in the honey bee: Its significance and relationship to other

hymenoptera. **Lipids**, v. 21, n. 1, p. 97-101, 1986.

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.

TASSINARI, W. S.; LORENZON, M. C.; PEIXOTO, E. L. Spatial regression methods to evaluate beekeeping production in the state of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 553-558, 2013.

TIAN, B.; FADHIL, N. H.; POWELL, J. E.; KWONG, W. K.; MORAN, N. A. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. **MBio**, v. 3, n. 6, p. 10.1128/mbio. 00377-12, 2012.

TIHELKA, E.; CAI, C.; PISANI, D.; DONOGHUE, P. C. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 14515, 2020.

TOTH, A. L.; ROBINSON, G. E. Worker nutrition and division of labour in honeybees. **Animal behaviour**, v. 69, n. 2, p. 427-435, 2005.

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, n. 6345, p. 1395-1397, 2017.

VALLEJO-MARÍN, M. How and why do bees buzz? Implications for buzz pollination. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 4, p. 1080-1092, 2022.

VILLALOBOS, S.; SEVENELLO-MONTAGNER, J. M.; VAMOSI, J. C. Specialization in plant–pollinator networks: insights from local-scale interactions in Glenbow Ranch Provincial Park in Alberta, Canada. **BMC ecology**, v. 19, p. 1-13, 2019.

WEGENER, J.; KRAUSE, S.; PARAFIANCZUK, V.; CHANIOTAKIS, I.; SCHILLER, J.; DANNENBERGER, D.; ENGEL, K. M. Lipidomic specializations of honeybee (*Apis mellifera*) castes and ethotypes. **Journal of Insect Physiology**, v. 142, p. 104439, 2022.

WILLE, H.; WILLE, M.; KILCHENMANN, V.; IMDORF, A.; BUHLMANN, G. Pollenernete und Massenvechsel von drei *Apis millefera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. **Revue suisse de zoologie**, v. 92, n. 4, p. 897-914, 1985.

WILLIAMS, J. R. Biomarkers of oxidative stress in atrazine-treated honey bees: A laboratory and in-hive study. 2016. **Tese de Doutorado**. Virginia Tech.

WINSTON, M. L. The biology of the honey bee. **harvard university press**, 1991.

WOODROW, A. W.; HOLST, E. C. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. **Journal of Economic Entomology**, v. 35, n. 3, p. 327-330, 1942.

YAN, H.; MENG, F.; JIA, H.; GUO, X.; XU, B. The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from *Apis cerana cerana*. **Journal of insectphysiology**, v. 58, n. 6, p. 782-791, 2012.

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

ZHANG, E.; NIEH, J. C. The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive

learning of simulated predation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 20, p. 3199-3205, 2015.

ZHAO, C.; ANG, Y.; WANG, M.; GAO, C.; ZHANG, K.; TANG, C.; LIU, X.; LI, M.; YANG, D.; MEIER, R. Contribution to understanding the evolution of holometaboly: transformation of internal head structures during the metamorphosis in the green lacewing *Chrysopa pallens* (Neuroptera: Chrysopidae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 20, p. 1-27, 2020.

ZUBROD, J. P.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRÜHL, C. A.; IMFELD, G.; KNÄBEL, A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J. J.; ROHR, J.; SCHARMÜLLER, A.; SAMLLING, K.; STEHLE, S.; SCHULZ, R. SCHÄFER, R. B. Fungicides: an overlooked pesticide class?. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 2019.

2. CAPÍTULO – EFEITO DA NUTRIÇÃO E DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS EM ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS AO FUNGICIDA FOX XPRO

RESUMO

A oferta natural de néctar, pólen e própolis pode não ser suficiente para atender às necessidades das colônias de abelhas melíferas, o que pode prejudicar seu desenvolvimento e torná-las mais vulneráveis a estressores, como agrotóxicos. Este estudo buscou avaliar se a suplementação nutricional, com ou sem própolis, poderia melhorar a saúde das abelhas expostas a um fungicida de ação tripla. Durante 22 semanas, cinco colônias de abelhas receberam suplementação nutricional (grupo S), enquanto outras cinco não foram suplementadas e tiveram acesso limitado ao pólen (grupo R). Após esse período, abelhas recém-emergidas foram mantidas em gaiolas por sete dias e alimentadas com pasta de pólen de girassol obtido de plantas tratadas (F+) ou não (F-) com o fungicida, além de xarope contendo (P+) ou não (P-) extrato de própolis. Em seguida, as abelhas foram dissecadas para avaliar a expressão de genes relacionados à saúde por PCR em tempo real. Foram registrados dados de consumo alimentar, peso das abelhas ao emergir (D0), teor proteico da hemolinfa em D0 e D7, e longevidade das abelhas. Abelhas das colônias suplementadas emergiram com maior peso e teor proteico na hemolinfa do que as do grupo não suplementado. O fungicida e a própolis reduziram o consumo de alimentos, e o fungicida afetou negativamente a expressão de genes relacionados à detoxificação, nutrição e imunidade. A própolis aumentou a expressão de todos os genes estudados. A longevidade foi maior em abelhas das colônias suplementadas, especialmente quando não expostas ao fungicida. Quando expostas, a própolis favoreceu a sobrevivência em comparação com a dieta com fungicida. Embora não tenham sido observados efeitos positivos da nutrição ou própolis na expressão gênica, ambos contribuíram para a longevidade das abelhas expostas ao fungicida de tripla ação.

Palavras-chave: alimentação proteica, bixafem, imunidade, protioconazol, trifloxistrobina

2. CHAPTER – EFFECT OF NUTRITION AND GREEN PROPOLIS ON BIOLOGICAL ASPECTS IN HONEY BEES EXPOSED TO THE FUNGICIDE FOX XPRO

Abstract

The natural supply of nectar, pollen, and propolis may not be enough to meet the needs of honey bee colonies, which can hinder their development and make them more vulnerable to stressors such as pesticides. This study aimed to evaluate whether nutritional supplementation, with or without propolis, could improve the health of bees exposed to a triple-action fungicide. During 22 weeks, five bee colonies received nutritional supplementation (group S), while five others were not supplemented and had limited access to pollen (group R). After this period, newly emerged bees were kept in cages for seven days and fed with sunflower pollen paste obtained from plants treated (F+) or not (F-) with the fungicide, as well as syrup containing (P+) or not (P-) propolis extract. Next, the bees were dissected to assess the expression of health-related genes by real-time PCR. Data on food intake, bee weight at emergence (D0), hemolymph protein content on D0 and D7, and bee longevity were recorded. Bees from the supplemented colonies emerged with higher weight and protein content in the hemolymph than those from the non-supplemented group. The fungicide and propolis reduced food consumption, and the fungicide negatively affected the expression of genes related to detoxification, nutrition, and immunity. Propolis increased the expression of all genes studied. Longevity was higher in bees from supplemented colonies, especially when not exposed to the fungicide. When exposed, propolis favored survival compared to the fungicide diet. Although no positive effects of nutrition or propolis on gene expression were observed, both contributed to the longevity of bees exposed to the triple-action fungicide.

Keywords: protein feed, bixafem, immunity, prothioconazole, trifloxystrobin

2.1 Introdução

As abelhas são essenciais para a manutenção dos ecossistemas florestais e a segurança alimentar, já que cerca de 75% das principais culturas agrícolas dependem da polinização cruzada para alta produtividade e qualidade de frutos e sementes (Rondeau e Raine, 2022). No entanto, mudanças antropogênicas nas paisagens e sistemas de produção têm pressionado os polinizadores, resultando na redução de suas populações e levando a desequilíbrios ambientais e menor produção de alimentos (Aizen et al., 2019). Com a previsão de crescimento da população humana, é crucial adotar métodos que aumentem a produção de alimentos sem prejudicar as populações de polinizadores, equilibrando o uso de agrotóxicos no controle de pragas e doenças (Godfray e Garnett, 2014).

O cultivo de monoculturas em grandes áreas, que reduz a vegetação nativa, pode prejudicar a nutrição das abelhas devido à menor abundância e diversidade de fontes de néctar e pólen (Hernández et al., 2021). Dietas desequilibradas, especialmente em combinação com a exposição a agrotóxicos, comprometem o desenvolvimento das abelhas e suas colônias. Esses fatores juntos podem reduzir a sobrevivência das abelhas e enfraquecer as colônias, levando-as ao declínio (Grassl et al., 2018).

Na agricultura, visando potencializar os efeitos de um fungicida, dois ou mais princípios ativos podem ser misturados num mesmo produto, de modo a se obter maior eficácia no controle de fungos patogênicos. No Brasil, um produto com tais características é o fungicida Fox® Xpro (BAYER, 2022), que apresenta ação mesostêmica e sistêmica contra fungos, sendo indicado para o uso nas culturas da cevada, girassol, milho, soja, trigo e feijão, para o combate de diversas doenças, como a Mancha em Rede, Alternaria, Ferrugem, entre outros (Pubchem, 2023).

Embora a toxicidade dos fungicidas seja relativamente menor que a dos inseticidas para as abelhas, a exposição a agrotóxicos desta classe pode aumentar a mortalidade das crias, reduzir a expectativa de vida das abelhas adultas, alterar o comportamento alimentar, dificultar o reconhecimento do ninho e diminuir a viabilidade dos espermatozoides dos zangões (Simone-Finstrom et. al., 2010).

Para tentar amenizar os efeitos decorrentes da exposição a agrotóxicos, é possível suplementar a dieta das abelhas, de modo a atender as exigências nutricionais inerentes às colônias, favorecendo o seu desenvolvimento e resistência a estressores ambientais (Alaux, 2010). Tosi et al. (2018) observaram que as abelhas que receberam uma dieta mais rica em nutrientes, incluindo proteínas e vitaminas, apresentaram uma menor taxa de mortalidade quando expostas á agrotóxicos em comparação com aquelas em uma dieta menos nutritiva.

Outra estratégia que tem sido pesquisada para favorecer a saúde das abelhas é a introdução de própolis na dieta destes insetos. Estudos mostram que a adição de própolis ao xarope de alimentação pode trazer benefícios significativos para as abelhas (Mura et al., 2020). Além disso, a incorporação de própolis em pastas proteicas também tem sido investigada com resultados promissores (Turcatto et al., 2017). Embora a própolis não seja tradicionalmente considerada um alimento, ela contém compostos bioativos que podem ser transferidos para o mel, proporcionando efeitos positivos na saúde das abelhas. Esses compostos, presentes naturalmente no mel devido à coleta de resinas pelas abelhas, têm propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que ajudam a fortalecer o sistema imunológico das abelhas e melhorar sua resistência a doenças e estresses ambientais (Berenbaum e Calla, 2021).

Uma dieta nutritiva é essencial para fortalecer a resistência das abelhas aos fungicidas. Estudos mostram que uma alimentação equilibrada, rica em proteínas e vitaminas, pode melhorar seu sistema imunológico. Além disso, a própolis também pode ajudar, pois favorece a saúde das abelhas e as protege contra diversas doenças (Johnson, et.al., 2010; Alaux et al, 2010). Portanto, é crucial garantir que as abelhas tenham acesso a uma boa alimentação e outros recursos naturais que as abelhas utilizam para elaborar a própolis, visando se manterem saudáveis e resilientes frente às perturbações ambientais (Alaux et al, 2010; Simone-Finstrom et al, 2017).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a suplementação nutricional e a adição de própolis verde à dieta de colônias de abelhas melíferas podem contribuir com a saúde das abelhas melíferas expostas a um fungicida de ação tripla, que contém os princípios ativos bixafem, protioconazol e trifloxistrobina.

2.2 Materiais e Métodos

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no setor de apicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena, sediado no município de Dracena, tendo como coordenadas geográficas: 21°27'33" de Latitude Sul e 51°33'22" de Longitude Oeste, a 392m de altitude (Figura 1).



Figura 1. Área da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena, na qual está instalado o apiário experimental utilizado nesta pesquisa. Fonte: Google Maps.

2.2 Colônias de abelhas melíferas e manejo alimentar

Foram selecionadas dez colônias padronizadas de abelhas melíferas (*Apis mellifera*), com rainhas acasaladas naturalmente, instaladas em colmeias tipo Langstroth e submetidas a dois manejos alimentares, por um período de 22 semanas. O primeiro manejo, aplicado em cinco colônias, consistia da suplementação (S) nutricional realizada semanalmente com 100g de pasta proteica, que continha três partes de pólen apícola e uma parte de mel silvestre, obtidos do apiário no qual a pesquisa foi desenvolvida. Além da pasta proteica, estas colônias receberam 500ml de xarope energético, à base de açúcar e água em proporções iguais, duas vezes por semana. As outras cinco colônias foram submetidas ao segundo manejo alimentar, que consistia na redução (R) do acesso ao alimento proteico, por meio da instalação de coletores de pólen no alvado destas colmeias (Figura 2). Ademais, estas colônias não receberam qualquer tipo de suplemento alimentar.



Figura 2. Colmeia com coletor de pólen para manejo de colônia do grupo com redução do acesso ao alimento proteico (A) e detalhe da gaveta do coletor com pellets de pólen (B). Fonte: Arquivo pessoal.

A coleta do pólen apícola das colônias do grupo R foi realizada diariamente, sendo registrado o peso de pólen apícola obtido por semana para cada colônia deste manejo alimentar, por meio do uso de uma balança semi-analítica,

Para estimar a quantidade de pólen que não ficava retida nos coletores de pólen, foi determinada a eficiência dos coletores. Para tanto, foi feita a observação visual e registro do número de abelhas campeiras ingressando nas colmeias por meio dos coletores e com bolotas de pólen nas corbículas, durante 30 minutos, entre 8 e 10h, em cada colmeia, com três repetições. Ao final de cada período de 30 minutos, os pellets de pólen que estavam dentro de cada gaveta dos coletores foram contados. Esses dados foram utilizados para determinar a eficiência dos coletores de pólen, que foi determinada a partir da fórmula:

Eficiência de coletor de pólen = nº de bolotas de pólen/ (2 X nº de abelhas com pólen) X 100.

2.3 Cultivo de girassol, tratamento com fungicida e obtenção de pólen

Para elaboração de dietas isoproteicas às quais abelhas oriundas de colônias dos dois manejos nutricionais, foi obtido pólen de girassol, a partir de plantas tratadas ou não com fungicida. Para tanto, foi realizado o cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.), da variedade CATI Multissol, numa área de 3.000 m², com espaçamento de 0,45 entre linhas e 0,40 m entre plantas. As adubações de plantio e cobertura foram realizadas conforme as recomendações de (Cantarella et al., 2022), e não foram utilizados quaisquer tipos de agrotóxicos para prevenir ou controlar pragas desta cultura.

Para coletar o pólen das plantas de girassol e impedir que as abelhas e outros insetos tivessem acessos às flores, centenas de inflorescências foram cobertas com sacos de TNT (Tecido Não Tecido) antes da antese (Figura 3). Com a maioria das flores abertas em cada inflorescência, os caules das plantas foram cortados e as partes contendo as inflorescências foram levadas para o laboratório.



Figura 3. Inflorescência coberta por saco de TNT. Fonte: arquivo pessoal.

Em seguida, as inflorescências foram retiradas dos sacos de TNT e colocadas sobre o solo, em área aberta, com o mesmo espaçamento utilizada na plantação (Figura 4), para a aplicação do fungicida Fox Xpro (Bayer, 2019). A área ocupada com as flores foi calculada para a determinação da quantidade de produto a ser aplicada, considerando-se a dose recomendada na bula do produto para o controle de *Alternaria helianthi*. Sendo assim, foi utilizado o equivalente a $0,5\text{L ha}^{-1}$ do fungicida 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.



Figura 4. Inflorescências de girassol dispostas sobre o chão para a aplicação do fungicida Fox Xpro. Fonte: Arquivo pessoal.

Após quinze minutos da aplicação, tempo necessário para que a calda secasse, as inflorescências foram recolhidas e levadas para o laboratório. Por meio de agitação manual das inflorescências sobre uma bandeja, ocorreu a liberação dos grãos de pólen (Figura 5), os quais foram acondicionados em tubos plásticos de 50 mL, que foram armazenados em ultrafreezer (-80°C). Para o grupo controle, o pólen foi obtido sem a aplicação do fungicida sobre as inflorescências.

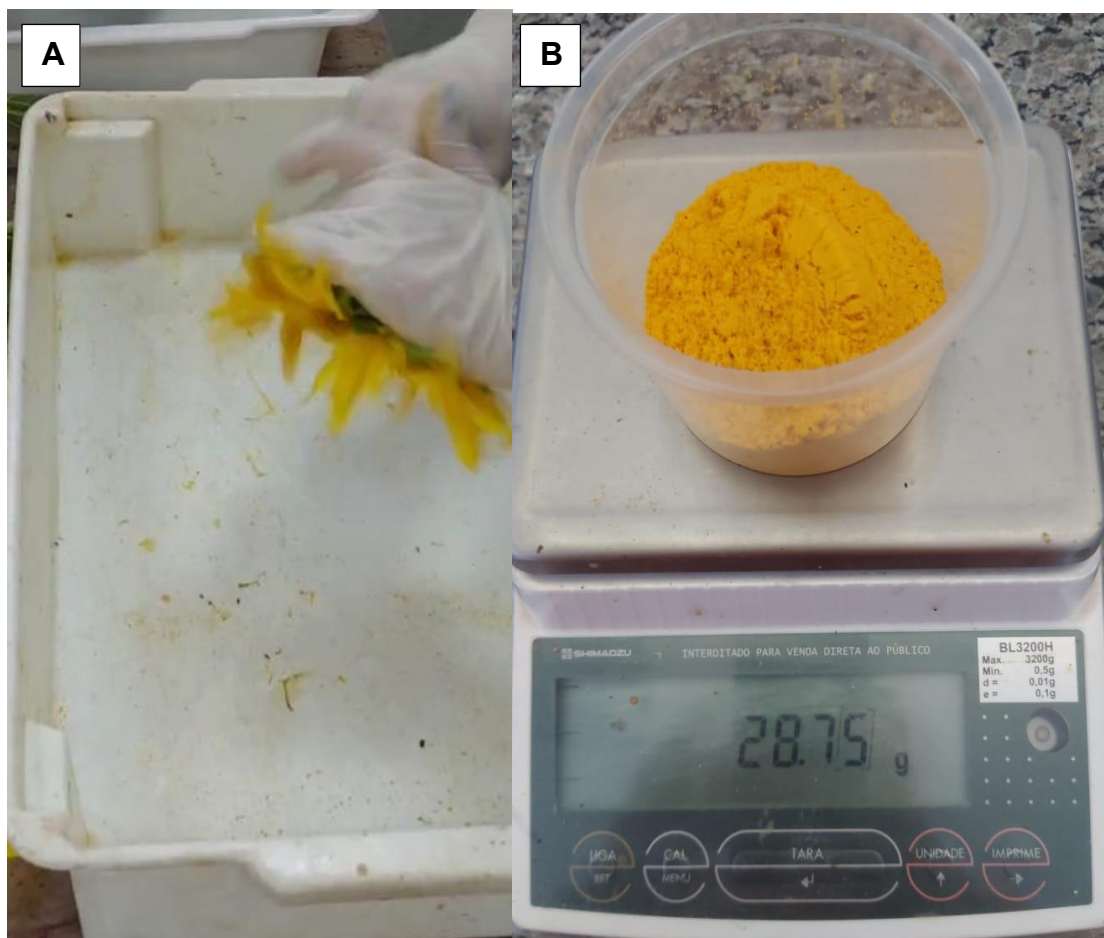


Figura 5. Retirada do pólen através de agitação. Fonte: arquivo pessoal.

2.4 Determinação da concentração de própolis na alimentação energética

Para a inclusão da própolis na alimentação energética, foi realizado um teste de toxicidade oral de xaropes com diferentes concentrações de extrato aquoso de própolis verde, da empresa Apis Flora, que contém 11% de extrato seco. Foram determinadas as doses 0%, 6,25%, 12,5%, 25% e 50% de extrato de própolis verde em xarope, que continha duas partes de açúcar de cana-de-açúcar e uma parte de água (OCDE, 1998) (Figura 6).

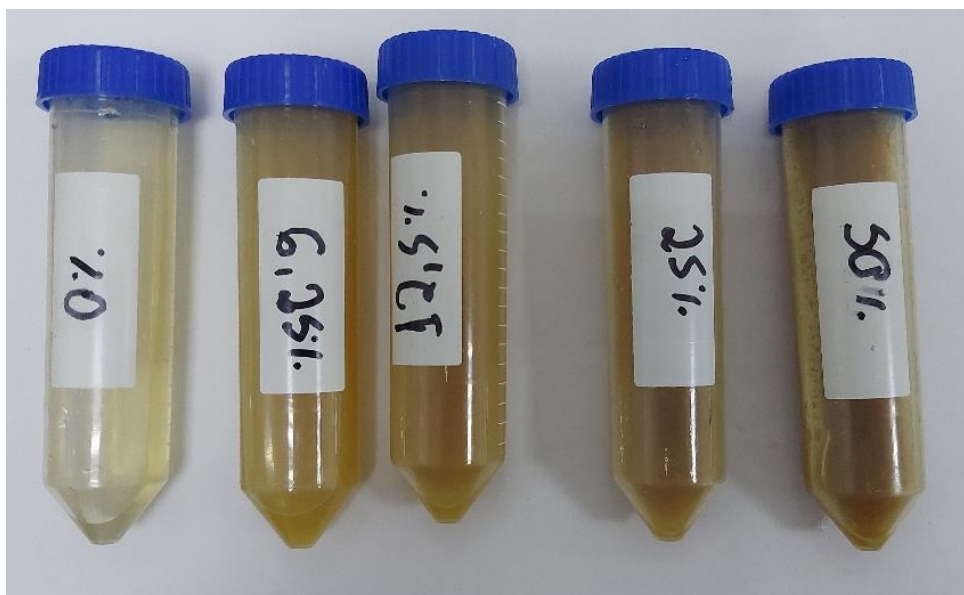


Figura 6. Xaropes energéticos à base de açúcar e água, contendo diferentes níveis de extrato aquoso de própolis verde. Fonte: Arquivo pessoal

Abelhas campeiras de colônias não submetidas ao manejo alimentar foram coletadas do alvado das colmeias e divididas em *pools* de 20 abelhas, introduzidos em gaiolas plásticas transparentes, com volume de 250mL, e que apresentavam tampa perfurada para permitir a troca gasosa. Junto à tampa, foi inserido um microtubo furado com agulha na parte inferior para que as abelhas pudessem acessar o xarope, que foi fornecido *ad libitum*. Três gaiolas para cada tratamento foram colocadas em incubadora com temperatura (33°) e umidade (70%) controladas, onde permaneceram por 96 horas. O número de abelhas mortas foi registrado diariamente.

Com base nos dados de mortalidade das abelhas, determinou-se que a concentração letal média (CL₅₀) foi de 54,4% (logaritmo da CL₅₀= 1,699; probit = 1,782xLog (Concentração) + 1,9053; coeficiente de determinação (R²) = 0,91; e erro padrão (SE) = 0,132. Considerando-se estas informações, optou-se por utilizar alimento energético com a menor concentração de extrato de própolis avaliada, que foi equivalente a 11,5% da CL₅₀ calculada.

2.5 Obtenção de abelhas recém emergidas

Para todos os ensaios descritos a seguir, foram retirados quadros com abelhas prestes a emergir das colônias submetidas a um dos manejos alimentares (S e R) (Figura 7). No laboratório, os quadros foram acondicionados em caixas com laterais de tela, os quais foram colocados em incubadora com temperatura (33°C) e umidade (70%) controladas, onde permaneceram por 12 horas até a coleta das abelhas.



Figura 7. Coleta manual de abelhas recém emergidas de quadros retirados das colônias submetidas ao manejo alimentar. Fonte: Arquivo pessoal.

A coleta foi realizada de maneira manual com as mãos devidamente higienizadas. Abelhas recém emergidas foram agrupadas em pools com vinte indivíduos oriundos de colônias com o mesmo manejo alimentar, e colocadas em gaiolas plásticas com volume de 250mL, com tampa perfurada para permitir a troca gasosa e com entradas para receber os alimentadores (Figura 8).



Figura 8. Gaiola adaptadas para receber uns *pools* de abelhas. Fonte: Arquivo pessoal

2.6 Avaliação do peso das abelhas recém emergidas

Abelhas recém emergidas de cada manejo alimentar foram acondicionadas em gaiolas plásticas de 250mL, que foram introduzidas em freezer (-20°C) por 20 minutos. Constatada a morte dos insetos, as abelhas de acordo com o manejo experimental das colônias foram divididas em grupos com indivíduos. Cada grupo foi colocado num cadinho, pesado em balança analítica antes e após a colocação das abelhas. Posteriormente, os cadinhos foram colocados em estufa com circulação de ar a 105°C por 16 horas, para secagem. Após esse período, os cadinhos com as abelhas foram pesados novamente. Por meio dos dados obtidos, determinou o peso das abelhas antes e após a secagem e a relação entre o peso seco e o peso fresco (AOAC, 1990).

2.7 Alimentação das abelhas contendo extrato aquoso de própolis e pólen de girassol em gaiolas

Foi preparado um xarope energético contendo duas partes de açúcar de cana-de-açúcar e uma parte de água. Em seguida, foi acrescido o extrato aquoso de própolis verde a este xarope, em concentração de 6,25% em relação ao volume total de xarope. Este alimento energético enriquecido com extrato aquoso de própolis foi disponibilizado às abelhas por meio de microtubo introduzido na tampa, com acesso ao xarope por meio de um furo feito com agulha na extremidade inferior do microtubo.

O alimento proteico continha três partes de pólen de girassol (oriundo de plantas tratadas ou não com fungicida) e uma parte de mel. Após a mistura destes ingredientes, a pasta obtida foi colocada em microtubos utilizados como cochos, os quais tiveram suas extremidades abertas com faca para permitir o acesso das abelhas a este alimento.

Dessa forma, foram estabelecidos seis tratamentos em esquema fatorial, considerando o manejo alimentar das colônias (S ou R), a exposição das flores ao fungicida (F+) ou não (F-) e a inclusão de extrato aquoso de própolis verde ao xarope (P+) ou não (P-). Para cada tratamento, foram utilizadas três gaiolas com 20 abelhas. As quantidades fornecidas e consumidas de alimento energético e proteico foram registradas diariamente, por meio da pesagem em balança analítica dos alimentadores vazios, e dos alimentadores com alimento antes do oferecimento nas gaiolas e após o período de consumo. Esse procedimento foi realizado durante sete dias e neste período as gaiolas permaneceram em incubadora com temperatura (33°C) e umidade (70%) controladas (Figura 9).



Figura 9. Incubadora onde permaneceram as abelhas durante o processo de tratamento alimentar. Fonte: Arquivo pessoal.

2.8 Avaliação da longevidade das abelhas

Foram utilizadas 480 abelhas recém emergidas, sendo metade oriunda de cada grupo de colônias submetidas aos dois manejos nutricionais, as quais foram divididas em 24 gaiolas com as mesmas características que as demais já descritas. As gaiolas permaneceram em incubadora, com três repetições por tratamento (2 manejos alimentares das colônias de origem das abelhas, 2 pastas proteicas e 2 xaropes energéticos). A alimentação foi fornecida diariamente *ad libitum* e com a mesma frequência foi registrado o número de abelhas mortas em cada gaiola.

2.9 Quantificação de proteínas na hemolinfa das abelhas

Abelhas recém emergidas de ambos os manejos alimentares das colônias foram separadas em dois grupos, sendo o primeiro para a análise no dia da emergência (D0) e o segundo para análise após sete dias (D7), com as abelhas

recebendo as dietas experimentais com pasta proteica com pólen de girassol contaminado ou não com fungicida e xarope energético com extrato aquoso de própolis verde ou não.

Foram coletados pools com 10 μ l de hemolinfa de abelhas do mesmo tratamento, a partir de orifício aberto por meio da retirada das antenas das abelhas e pressão com o dedo indicador sobre o tórax da abelha (Borsuk et al, 2017) (Figura 10).

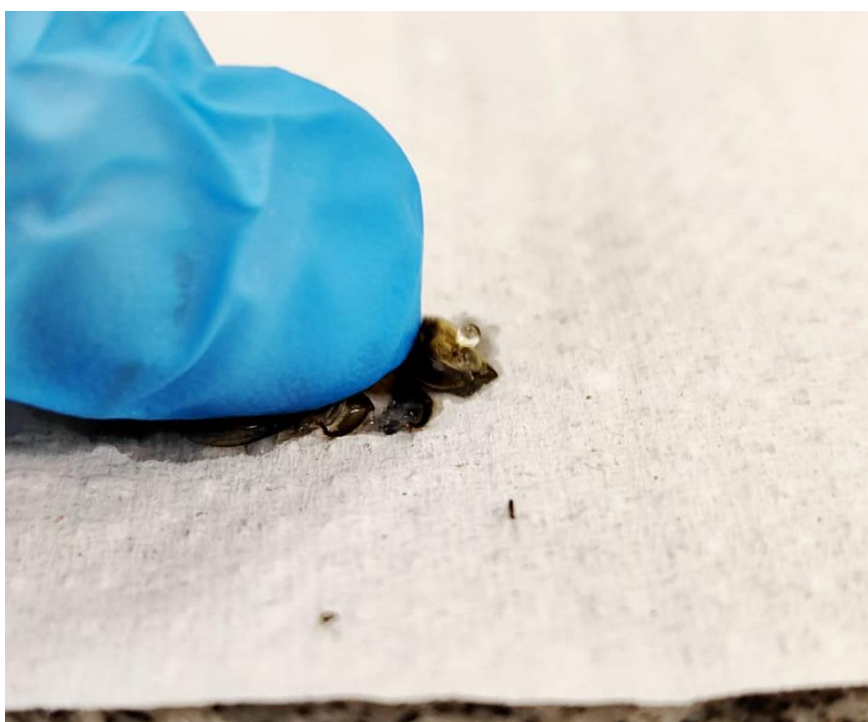


Figura 10. Extração de hemolinfa pela cavidade das antenas. Fonte: Arquivo pessoal.

A quantificação das proteínas foi feita por meio do método de Bradford (1976), em placas de Elisa de fundo achatado (Figura 10) e processado em Biochrom EZ Read 2000 Microplate Reader. Para determinar a quantidade de proteína, foi utilizada a equação da curva padrão de albumina. Esta curva foi determinada previamente e utilizada como referência na análise, permitindo a comparação e obtenção dos valores de interesse.

2.10 Extração de RNA e construção de biblioteca de cDNA

Para avaliação da expressão gênica, abelhas recém emergidas foram submetidas às dietas experimentais por sete dias. Em seguida, as abelhas passaram por insensibilização em freezer (-20°C) por alguns minutos. Uma vez anestesiadas, foram fixadas individualmente em placa de vidro com cera. Com auxílio de tesoura, pinças entomológicas e lupa, as abelhas tiveram os abdomens separados, desprezando-se cabeça, tórax e intestino (Figura 12). Cerca de 100 mg de material (equivalente a seis abdomens) foram reservados em microtubos, os quais foram armazenados em ultrafreezer (-80°C), com seis repetições para cada tratamento, que foram posteriormente analisados.

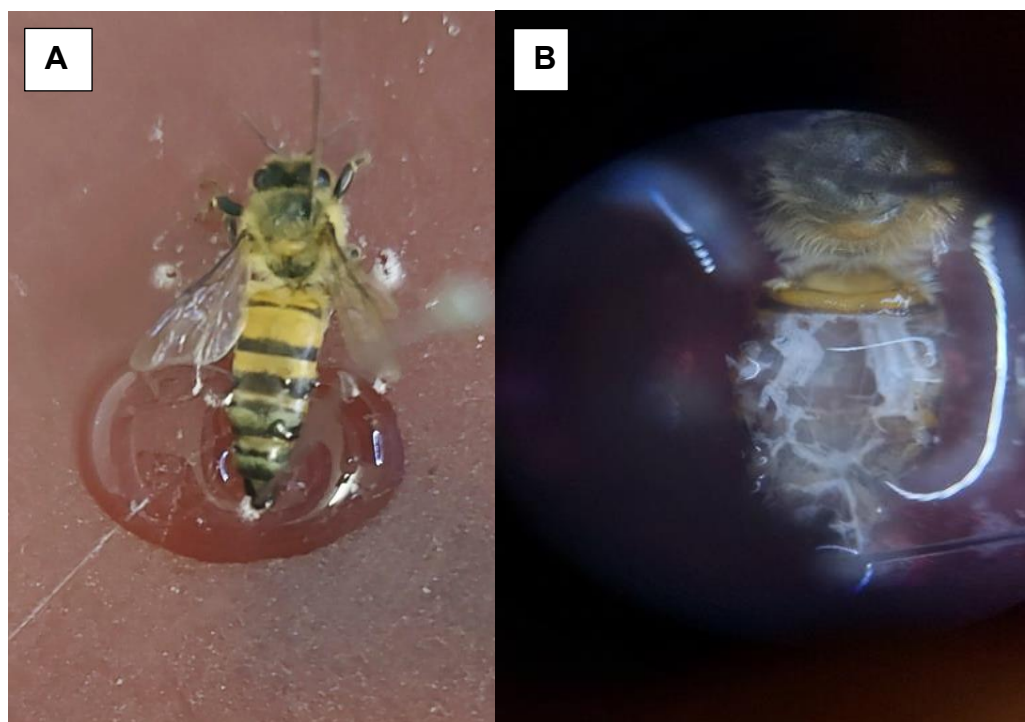


Figura 12. Abelha em processo de preparo para dissecação (A) e detalhe da abelha após a retirada do intestino (B) Fonte: Arquivo pessoal

Foi realizada a análise do transcriptoma por qPCR em Real Time, dos primers descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Genes, suas respectivas sequências de primer (GenBank) e referências

GENE	SEQUÊNCIA (5'-3')	REFERÊNCIA
RIBOSOMAL PROTEIN 49 (RP 49)	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	Lourenço et al. (2008)
CATALASE (CAT)	F: TGGAGCAAGTCCTGATAAAATGC R: AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC	Lourenço et al. (2008)
SUPEROXIDE DISMUTASE MANGANES DEPENDENTE (MNSOD)	F: GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC R: AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC	Lourenço et al. (2008)
COBRE-ZINCO SUPERÓXIDO DISMUTASE (CUZNSOD)	F: GTCGTTCCGTGTAGTCGAGAA R: TCCTTTGACTTCACCCTGAAGA	Lourenço et al. (2008)
GLUTATHIONA STRANSFERASE 1 (GST-1)	F: TGCCGATCGATTTTTATCAACTT R: AGCCGTCAACGCAACTGC	Lourenço et al. (2008)
CYTOCHROME P450 306A1 (CYP306A1)	F: CGTCGATGGGAAGGATAAAA R: TCGGTGAAATATCCCGATTC	Lourenço et al. (2008)
VITELOGENINA	F: TCGACAACTGCGATCAAAGGA R: TGGTCACCGACGATTGGATG	Simone et al. (2009)
HEXAMERINA	F: AACTCGCTCAACTTTCCACAA R: GGCTCACATAACTAACCTCACC	Lourenço et al. (2008)
DEFENSINA-1	F: TGCGCTGCTAACTGTCTCAG R: AATGGCACTTAACCGAAACG	Siede et al. (2012).
ABAECINA	F: AGATCTGCACACTCGAGGTCTG R: TCGGATTGAATGGTCCCTGA	Lourenço et al. (2008)
HIMENOPTAECINA	F: CTCTTCTGTGCCGTTGCATA R: GCGTCTCCTGTCATTCCATT	Lourenço et al. (2008)
APIDAECINA	F: CTTTGTAGTCGCGGTATTTGG R: AGGCGCGTAGGTCGAGTAG	Lourenço et al. (2008)

Para a extração de RNA, os abdomens passaram por um processo de trituração em conjunto com 1 ml de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™) (Figura 13 A), depois desse processo esperar cinco minutos e passar o conteúdo para um eppendorf. Nesse novo eppendorf se adiciona 200 µL de clorofórmio e agitado em

um vortex por 15 segundos, o líquido proveniente desse processo foi centrifugado a 12.000 x g, por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante obtido transferido com ajuda de uma pipeta para um novo eppendorf, onde foi adicionado 0,5 ml de isopropanol. Essas amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12.000 x g, por 10 minutos a 4°C. Dessa vez, o sobrenadante foi descartado e os pellets de RNA restantes passaram por um processo de lavagem por três vezes, recebendo uma dose de 1000 µL de etanol (Figura 13 B) e centrifugados a 7500xg, por 5 minutos a 4°C. Depois centrifugados, mais uma lavagem é feita com 500 µL de etanol e tiveram seu sobrenadante novamente descartado e, por fim, foram deixados de repouso por 15 minutos para a secagem dos pellets. Por último, os pellets foram suspensos com 100 µL água molecular e deixados para descansar mais 5 minutos e posteriormente dissolvidos com uma pipeta.

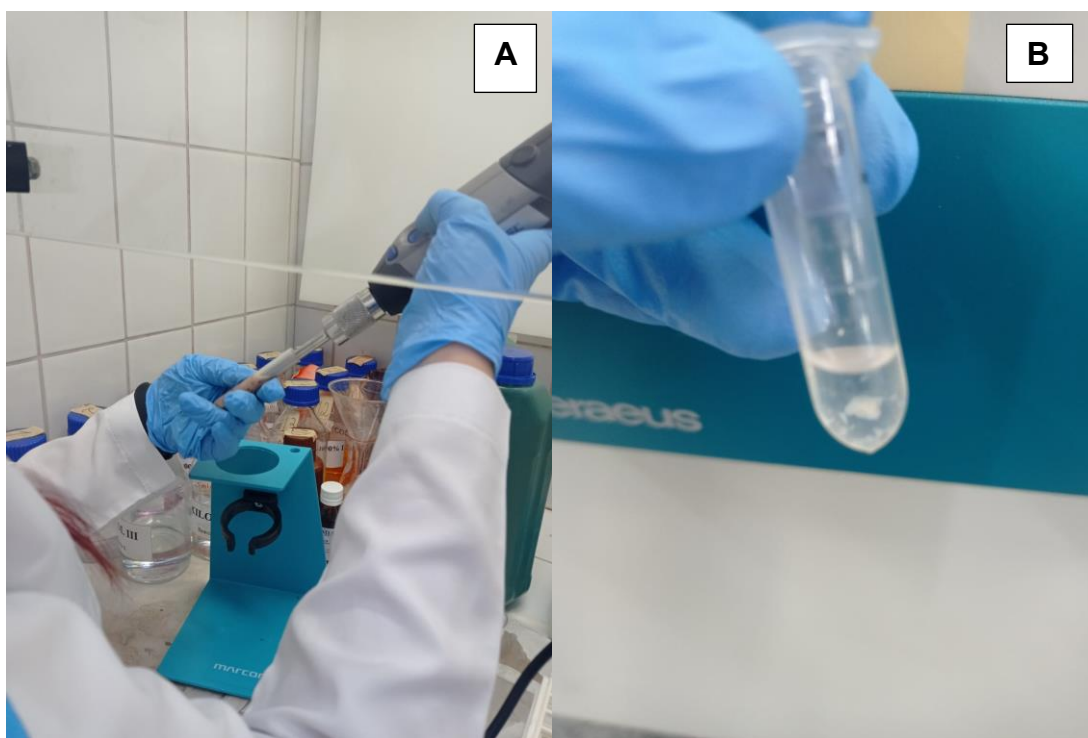


Figura 13. Processo de trituração dos abdomens em conjunto com o trizol (A) e microtubo com pellet de RNA durante o processo de lavagem (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Após o isolamento do RNA, foi realizada a quantificação através de absorbância de 260nm utilizando o Nanodrop-1000 (Thermo Scientific) (Figura 14). A

partir do RNA extraído foi construída a biblioteca de cDNA, através da transcrição reversa (RT) usando 1 mg de RNA total e iScript™ III (Life Technologies). O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até o uso. Em seguida, a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers alvos, referentes às abelhas.

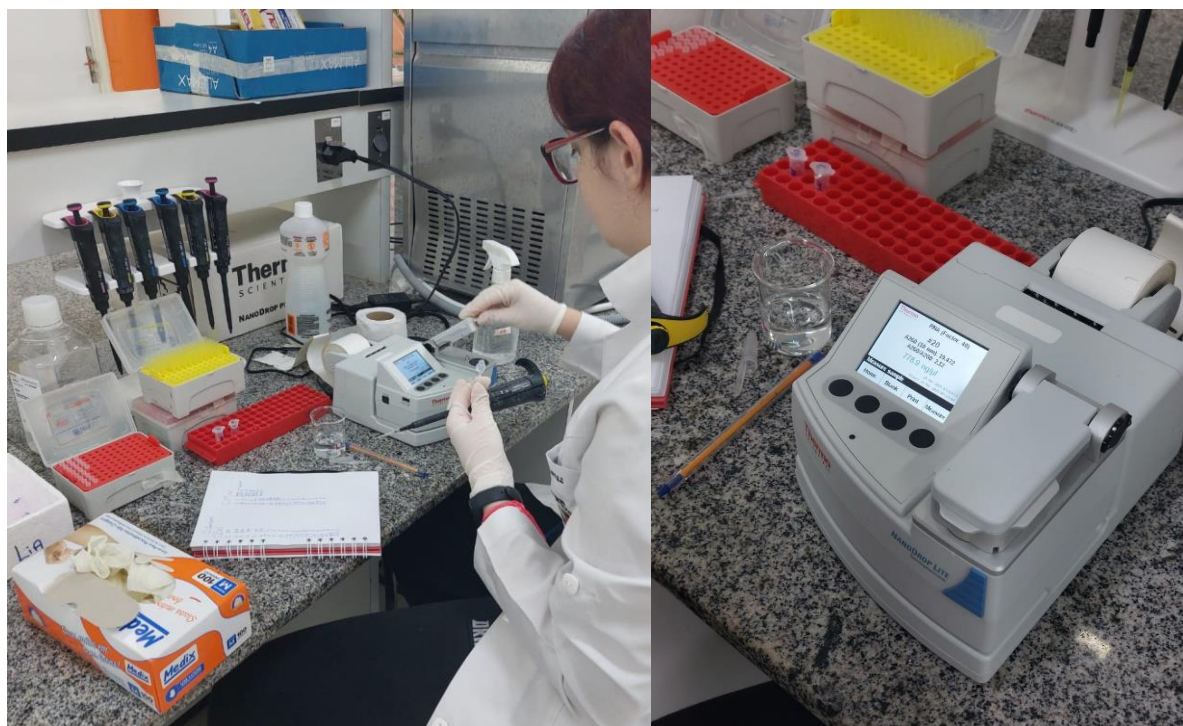


Figura 14. Quantificação do RNA através de absorbância de 260nm em ng utilizando o Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Fonte: Arquivo pessoal.

2.11 Determinação molecular da expressão de genes

A determinação molecular da expressão de genes foi realizada por meio do método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT) e os resultados foram analisados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl et al., 2004; Rebouças et al., 2013).

O processo para o qPCR foi realizado em placas de 96 poços, usando iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). As reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, com reações individuais, sendo depositados 20 µl por

poço, formado pela mescla de 10 µl do complexo principal de PCR SYBRGreen (2x), 8 µl de iniciadores 200 nM e 2 µl de molde de cDNA (amostras) (Rebouças et al., 2013).

Todas as reações foram realizadas no sistema de detecção de qPCR em tempo real iCycler iQ™ (Bio-Rad Laboratories), sob o protocolo: 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, seguido por análise da curva de dissociação (curva de fusão) para verificar a amplificação de um único produto. As temperaturas para os ciclos desnaturação-hibridização-síntese utilizados foram adequados de acordo com a literatura, para resultar na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado (Pfaffl, 2004).

O limiar da fase exponencial denominado de Cycle Threshold (Ct), foi detectado durante os ciclos de temperatura, quantificando-se exatamente os produtos da reação de amplificação devido à emissão de fluorescência. Os dados de expressão foram usados para calcular o valor do ciclo limite (Ct). A eficiência da PCR e a taxa de expressão relativa de genes alvo em grupos experimentais versus grupos de controle foram calculadas de acordo com o método de (Pfaffl et al., 2004). O método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta}$ método de CT) foi usado para analisar o nível de expressão desses genes em relação ao EF-1β. Todas as medições da expressão alvo foram normalizadas em relação ao gene RP49.

2.12 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. O fator principal foi o manejo alimentar das colônias, em dois níveis (alimentação suplementada e alimentação reduzida). Os fatores secundários, aplicados em esquema fatorial, foram presença de fungicida na pasta proteica (com ou sem) e presença de própolis no xarope (com ou sem).

Os dados de consumo de pólen (mg) e própolis (ml) foram analisados utilizando o software SAS (versão 9.4) e os dados de expressão gênica, com transformação logarítmica, foram analisados por meio do software R (versão 4.4.1). As médias ajustadas para todas as combinações do mesmo nível de manejo nutricional e entre médias de ambos os manejos que receberam a mesma suplementação alimentar

foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($p < 0.05$). Os dados de expressão gênica foram analisados por meio do software R (versão 4.4.1).

2.13 Resultados

2.13.1 Manejo alimentar e quantidade obtida de pólen nas colônias submetidas à restrição alimentar

Durante o período de 22 semanas de manejo alimentar, foi recolhido diariamente pólen dos coletores instalados nas colmeias do grupo com alimentação reduzida (R) (Figura 15). Semanalmente, em média, foram obtidos $61,48 \pm 12,05$ g por colmeia. Durante o período de manejo, foram coletados de 1.087,46 a 1.617,66g de pólen por colônia (R). Já no grupo de colônias suplementadas (S), o total de pasta proteica fornecida durante o período de manejo foi de 2.200g, contendo 1.650g de pólen em sua composição e 22L de xarope energético. Inicialmente cinco colônias foram selecionadas para cada grupo, porém uma colônia R definhou, dessa forma para poder igualar os resultados de ambos os grupos, uma colônia do grupo S foi retirada do experimento.

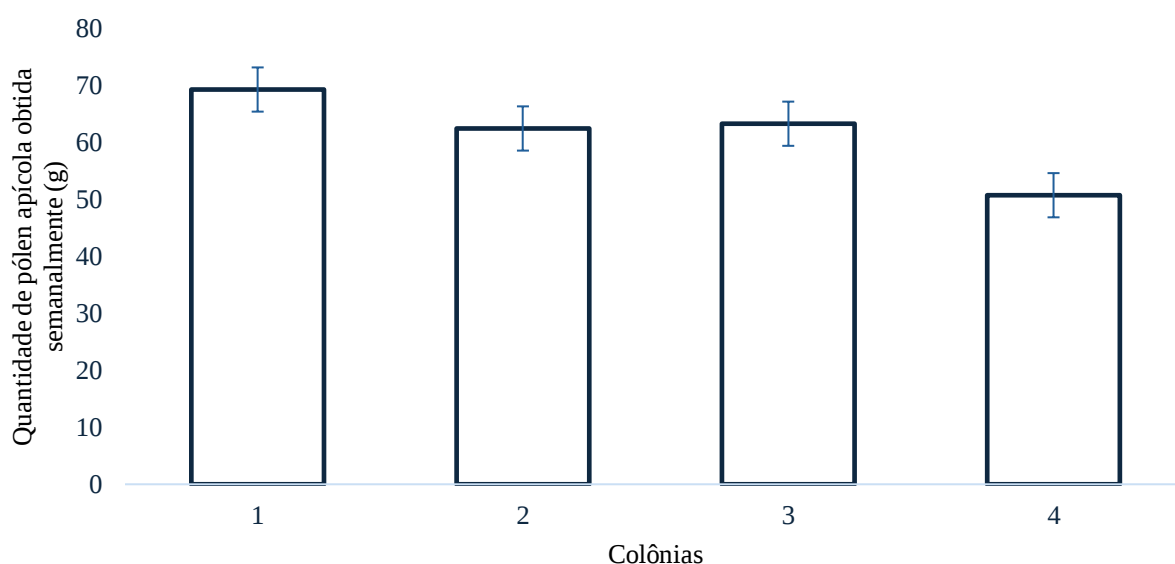


Figura 15. Quantidade de pólen apícola obtida semanalmente em quatro colônias de abelhas melíferas, durante 22 semanas.

2.13.2 Eficiência dos coletores de pólen

Foram realizadas seis observações diferentes em períodos de 30 minutos em cada colmeia, sendo obtido uma eficiência média de $67,6 \pm 1,99\%$ dos coletores de pólen apícola. Dessa maneira, em conjunto com a informação da quantidade de coleta semanal de pólen dos coletores é possível estimar que durante as 22 semanas as abelhas conseguiram utilizar uma quantidade de 521,21 a 775,33g de pólen para dentro das colmeias, sendo semanalmente uma quantidade de 23,69 a 35,24g por colmeia do grupo R.

2.13.3 Peso vivo e peso seco de abelhas recém-emergidas

As abelhas do grupo S apresentaram um peso ao nascer maior do que as do grupo R. Essa diferença foi significativa tanto para o peso vivo quanto para o peso seco das amostras de abelhas. No entanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa na proporção entre peso seco e peso vivo entre os dois grupos em avaliação (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de peso vivo e peso seco (mg) e relação peso seco: peso vivo de abelhas melíferas recém-emergidas, obtidas de colônias com suplementação ou restrição nutricional.

Efeitos		Peso Vivo (PV)	Peso Seco (PS)	PS:PV
Alimentação	Suplementada	96,07a ¹	15,32a	15,96
	Reduzida	90,40b	14,61b	16,16
Erro padrão da média		1,53	0,17	0,16
Valor de P		0,041	0,006	0,588

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($P < 0.05$), de acordo com o teste de Tukey. Médias obtidas a partir de 10 indivíduos de abelhas oriundas de colônias do mesmo manejo nutricional.

2.13.4 Consumo de pasta proteica durante o período que antecedeu a coleta dos abdomens

Durante os sete dias de alimentação em gaiolas, foi observada que não ocorreu interação significativa entre o fator manejo nutricional das colônias e os tratamentos com fungicida e própolis ($P < 0,001$) (Tabela 3). Apenas foi observado que as abelhas do grupo S se alimentaram de uma quantidade significativamente maior da pasta proteica sem fungicida e sem própolis em relação ao grupo R.

No grupo S foi possível observar que as abelhas que receberam pólen contaminado com fungicida consumiram menos pasta em relação as que receberam pólen sem contaminação, a própolis não teve influência nessa relação de consumo. No grupo R, apenas o tratamento F+P- se diferenciou dos outros tratamento, apresentando um menor consumo.

Tabela 3. Consumo diário de pasta proteica (mg), contendo pólen com (F+) ou sem (F-) fungicida, na presença xarope contendo (P+) ou não (P-) extrato de própolis verde, por abelhas melíferas oriundas de colônias com suplementação ou restrição alimentar.

Alimentação das colônias	Tratamentos				SE
	F+P+	F+P-	F-P+	F-P-	
Suplementada	1,67Ab ¹	1,57Ab	3,52Aa	4,57Aa	0,33
Reduzida	2,24Aa	1,71Ab	3,14Aa	2,48Ba	0,33

¹Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

2.13.5 Consumo de xarope durante o período que antecedeu a coleta dos abdomens

o consumo de xarope por abelha (9,51 $\mu\text{L}/\text{dia}$) não foi influenciado pelos tratamentos com ou sem fungicida na pasta proteica e presença ou ausência de extrato de própolis verde no xarope, entre abelhas melíferas oriundas de colônias com suplementação ou restrição alimentar.

2.13.6 Teor de proteína na hemolinfa

No dia de emergência das abelhas (D0), foi observado que o teor de proteínas na hemolinfa de abelhas recém-emergidas foi significativamente maior ($P < 0,001$; erro SE = 0,371) em indivíduos provenientes de colônias que receberam suplementação alimentar (8,94 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), em comparação com abelhas obtidas em colônias com alimentação reduzida (6,76 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Posteriormente, outras abelhas recém-emergidas, provenientes das mesmas colônias, foram alimentadas por sete dias com pasta proteica contendo pólen contaminado ou não com o fungicida Fox Xpro®, além de xarope energético com ou sem extrato aquoso de própolis verde. Após esse período de alimentação em gaiolas, foi observado efeito da interação entre a contaminação do alimento proteico com o fungicida e a adição de extrato de própolis verde ao xarope energético quanto ao teor de proteínas na hemolinfa das abelhas melíferas (Tabela 4).

O teor de proteínas na hemolinfa não tiveram direção entre os dos grupos alimentares, porém apresentaram diferenças por tratamento. As abelhas que foram alimentadas com pasta sem fungicida e xarope sem própolis apresentaram um maior teor de proteína em relação aos outros tratamentos. O tratamento que incluiu apenas própolis no xarope apresentou um teor menor do que o tratamento sem nenhuma adição. As abelhas alimentadas com pasta proteica contaminada com fungicida tiveram um teor de proteína significativamente menor, independente se o xarope continha ou não própolis.

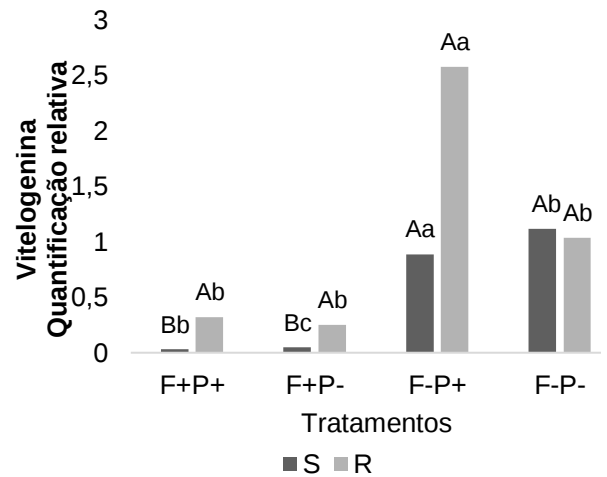
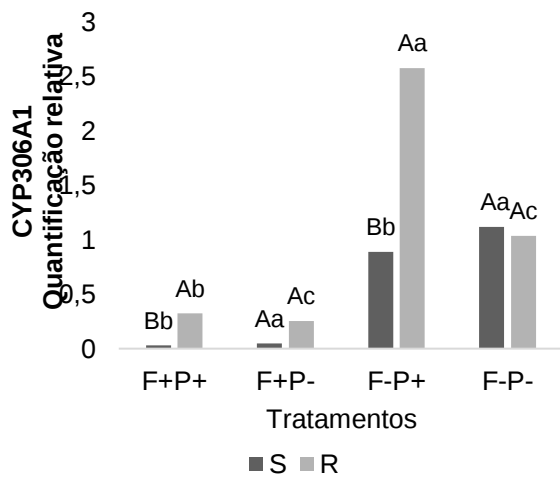
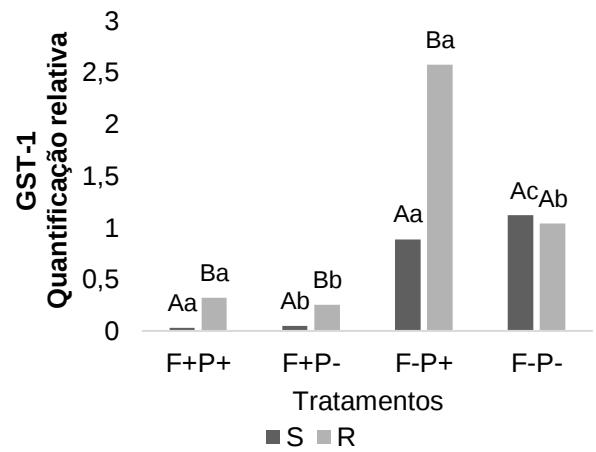
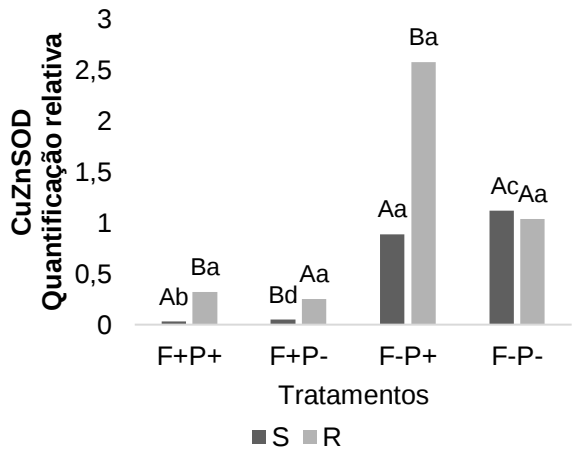
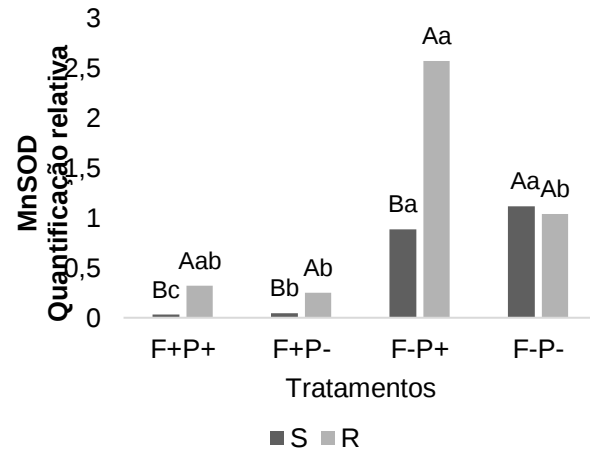
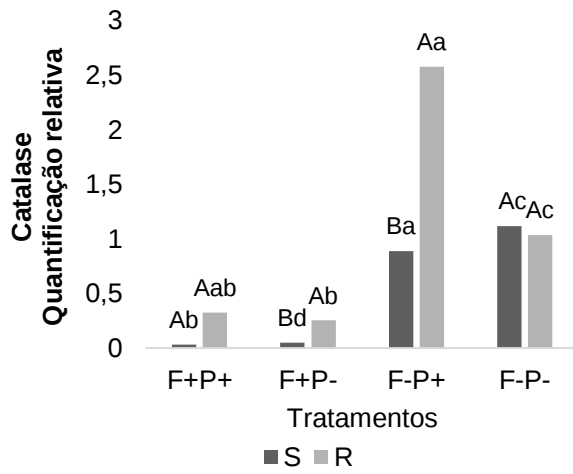
Tabela 4. Teor de proteínas da hemolinfa ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) após período de sete dias no qual as abelhas melíferas, oriundas de colônias com suplementação ou restrição alimentar, consumiram pasta proteica contendo pólen com (F+) ou sem (F-) fungicida e xarope contendo (P+) ou não (P-) extrato de própolis verde, por abelhas melíferas.

Alimentação das colônias	Tratamentos				SE
	F+P+	F+P-	F-P+	F-P-	
Suplementada	5,39bc ¹	3,77c	7,87b	11,06a	0,56
Reduzida	4,84c	3,62c	9,08b	11,80a	0,56

¹Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

2.13.7 Expressão dos genes de imunidade, estresse oxidativo e detoxificação

Para os genes do metabolismo oxidante e detoxificação, em geral ocorreu uma pronunciada suprarregulação nas abelhas que receberam o tratamento com acréscimo de própolis (F-P+) e tiveram respostas variadas em relação aos outros tratamentos (Figura 18). Não houve diferença na expressão de todos dos genes estudados, em comparação aos grupos controle de abelhas de ambos os manejos alimentares.



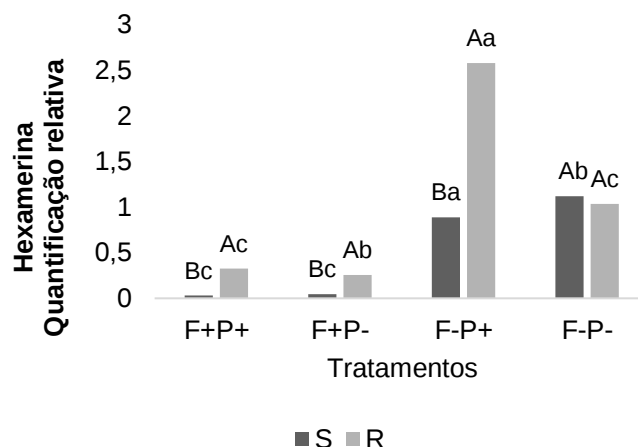


Figura 16. Quantificação relativa dos genes Catalase, MnSOD, CuZnSOD, GST-1, CYP305A1 Vitelogenina e Hexamerina, a partir da avaliação do corpo gorduroso de abelhas melíferas oriundas de colônias com suplementação (S) ou restrição (R) alimentar e que nos sete primeiros dias de vida receberam pasta proteica com (F+) ou sem F- fungicida e xarope com (P+) ou sem (P-) extrato de própolis. *Médias seguidas por letras iguais, minúsculas para tratamentos do mesmo manejo alimentar e maiúsculas para a comparação do mesmo tratamento entre manejos alimentares, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

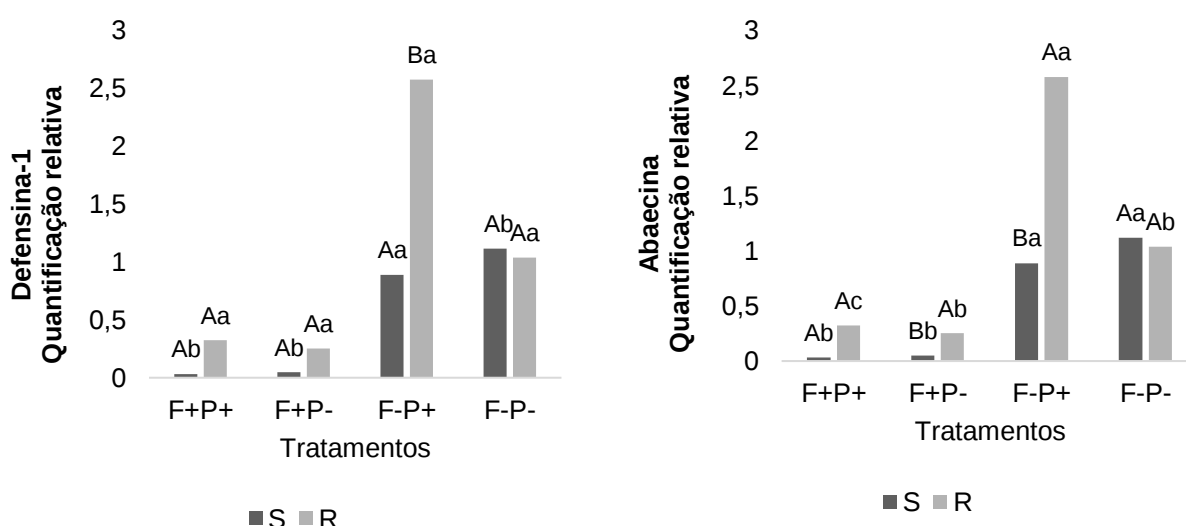
Para o tratamento em que as abelhas receberam pasta proteica contaminado com fungicida e xarope sem propolis (F+P-), os genes da Catalase (CAT), superóxido dismutase manganês-dependente (MnSOD ou SOD-2), Cobre-zinco Superóxido Dismutase (CuZnSOD ou SOD-1), Vitelogenina (Vg) e Hexamerina (HEX) apresentaram infraregulação para o grupo S e supraregulação para o grupo R, enquanto os genes Glutathione S-transferase theta 1 (GST-1) e Citocromo P450 306A1 (CYP306A1) tiveram uma suplaregulação para o grupo S e não houve diferença significativa do grupo R em relação ao controle.

Os genes CAT, GST-1, Vg e HEX no tratamento em que as abelhas receberam xarope com propolis e pasta proteica sem fungicida (F-P+) apresentaram supraregulação em ambos os grupos R e S. No gene MnSOD teve supraregulação do grupo R e não teve diferença significativa no grupo S, já o gene CuZnSOD teve um

resultado reverso, com suprarregulação no grupo S e sem diferença no grupo R. O CYP306A1 apresentou suprarregulação no grupo R e diferente dos outros genes, o grupo S teve uma infraregulação.

Para o tratamento que leva fungicida e propolis (F+P+), os genes CAT, CuZnSOD e GST-1 tiveram suprarregulação em ambos os grupos S e R. Já os genes MnSOD e CYP306A1 apresentaram infraregulação do grupo S e suprarregulação do grupo R. No gene Vg, o grupo R apresentou infraregulação e o grupo S não teve diferença significativa em relação ao controle, esse comportamento pode ser observado de maneira inversa no gene Hex.

Já no caso dos genes ligados ao sistema imune, pode-se observar uma infraregulação da maioria dos genes nos tratamentos que levavam fungicida e novamente, uma suprarregulação no tratamento que foi administrado apenas a própolis para as abelhas. A regulação de ambos os grupos que estavam sobre tratamento do própolis em conjunto com o fungicida (F+P+) não diferenciaram entre si, mostrando que a administração de própolis não mitiga os efeitos dos fungicidas sobre esses genes (Figura 19). Nem todos os agrupamentos demonstraram diferença significativa em relação as abelhas do grupo controle (F-P-).



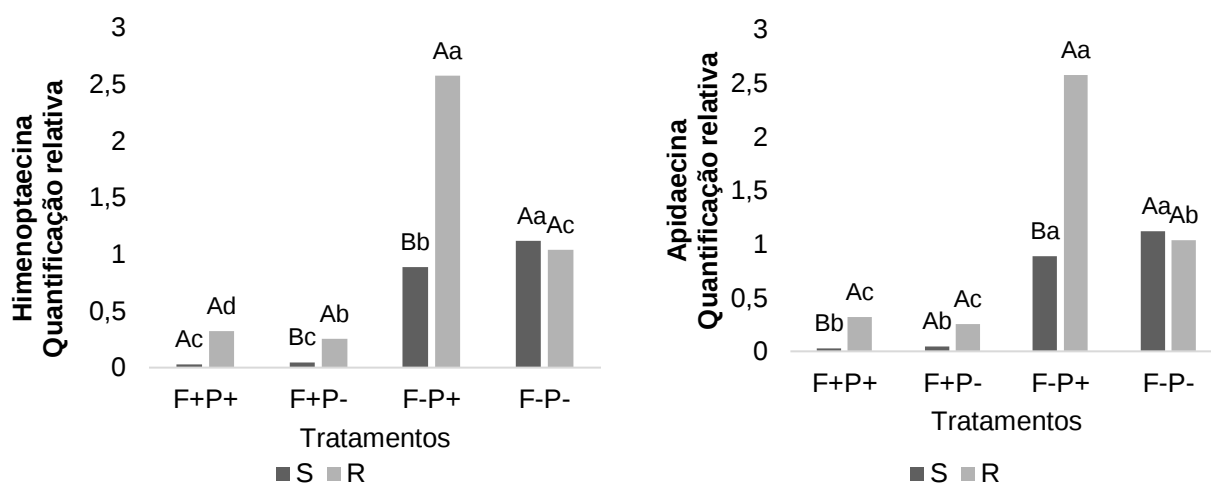


Figura 17. Quantificação relativa dos genes Defensina-1, Abaecina, Himenoptaecina e Apidaecina, a partir da avaliação do corpo gorduroso de abelhas melíferas oriundas de colônias com suplementação (S) ou restrição (R) alimentar e que nos sete primeiros dias de vida receberam pasta proteica com (F+) ou sem F- fungicida e xarope com (P+) ou sem (P-) extrato de própolis. *Médias seguidas por letras iguais, minúsculas para tratamentos do mesmo manejo alimentar e maiúsculas para a comparação do mesmo tratamento entre manejos alimentares, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No tratamento em que é oferecido as abelhas pasta contaminada e xarope sem própolis (F+P-), os genes Defensina-1, Abaecina e Apidaecina apresentaram infraregulação independente do grupo nutricional. Em contrapartida, o gene Himenoptaecina obteve uma supraregulação no grupo R e o grupo S apresentou infraregulação como os demais.

As abelhas do grupo R que receberam própolis e não fungicida (F-P+), apresentaram supraregulação em todos os quatros genes. Já as abelhas do grupo S, tiveram supraregulação apenas no gene Defensina-1, inflaregulação nos genes Abaecina e Himenoptaecina e não tiveram diferença significativa no gene Apidaecina.

Para o tratamento que possui a oferta de própolis e pasta contaminada (F+P+), todos os quatros genes apresentaram inflaregulação em ambos os grupos nutricionais.

2.13.8 Longevidade das abelhas alimentados com pólen com ou sem fungicida e xarope com ou sem própolis

No teste de longevidade, as abelhas do grupo S sob o tratamento F-P- tiveram maior longevidade em relação a todas as demais, sendo seguidas pelas abelhas do mesmo grupo nutricional do tratamento F-P+. As abelhas do grupo R do tratamento F-P+ e as abelhas do grupo S do tratamento F+P+, tiveram uma longevidade menor que as anteriores e correspondentes entre si. O grupo R do tratamento F-P-, apenas não apresentou longevidade menor que o grupo R do tratamento F+P+ e ambos os grupos sob o tratamento F+P-. (Figura 16).

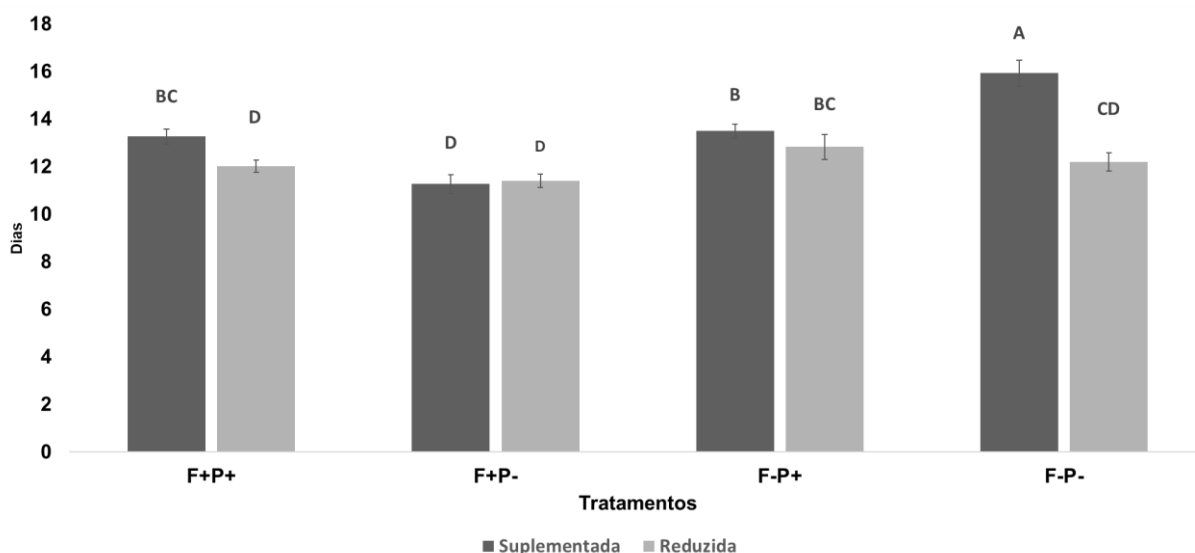


Figura 18. Tempo médio de vida das abelhas submetidas a cada um dos tratamentos e origem das colônias.

Observou-se que as abelhas que na fase de cria se desenvolveram em colônias suplementadas e que não receberam nem fungicida nem própolis (F-P-), tiveram uma sobrevivência significativamente maior do que as abelhas do mesmo grupo alimentar que foram expostas a pólen contaminado ou receberam própolis adicionado ao xarope. Além disso, as abelhas que se desenvolveram em colmeias com restrição alimentar e foram tratadas com pólen contaminado (F+P-; F+P+) demonstraram uma maior mortalidade em comparação com outros grupos (Figura 17). Essas observações

destacam a importância dos diferentes tratamentos na sobrevivência das abelhas ao longo do teste.

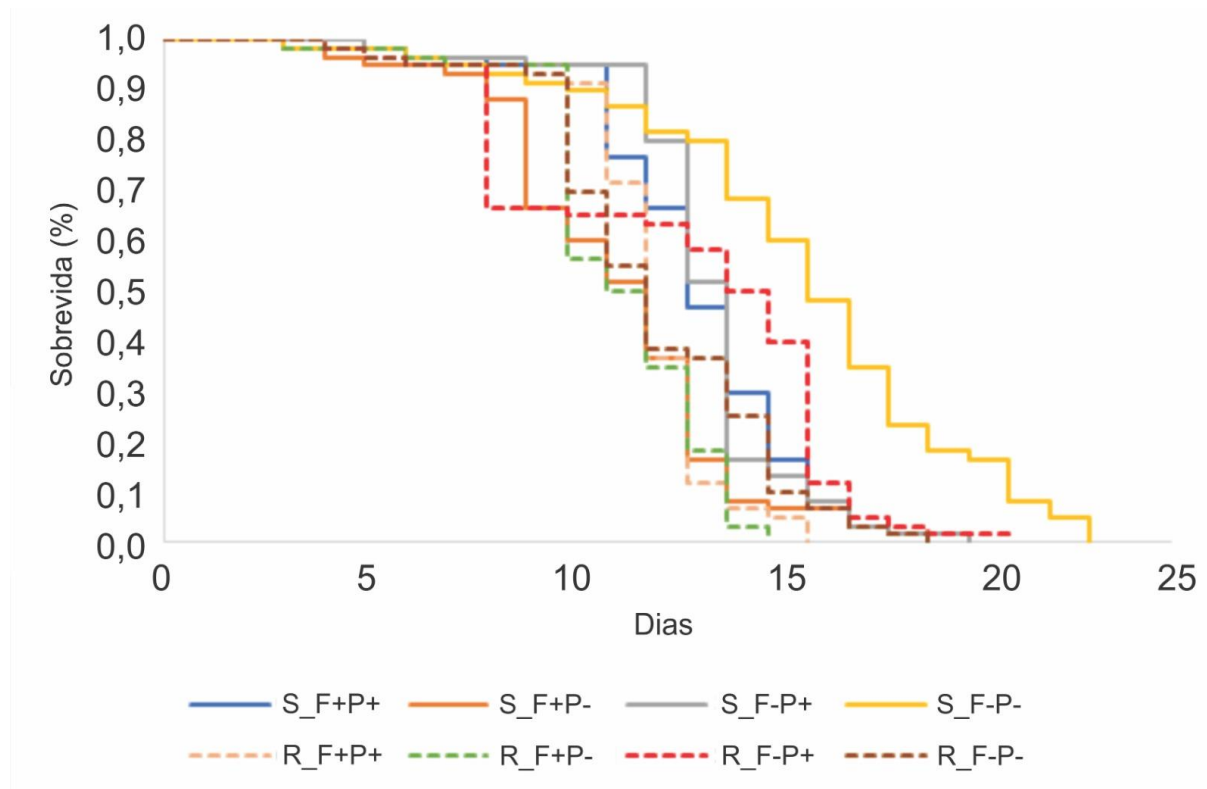


Figura 19. Gráfico de Kaplan Meier da longevidade de abelhas que na fase de cria se desenvolveram em colônias com suplementação (S) ou restrição (R) alimentar e que na fase adulta receberam alimento proteico contaminado ou não com fungicida.

3. Discussão

3.1 Manejo alimentar das colmeias

A eficiência da coleta de recursos pelas abelhas é grandemente influenciada pela dinâmica interna e desafios enfrentados pela colmeia. Em particular, a coleta de pólen, uma tarefa realizada pelas operárias, é ajustada conforme a demanda interna por suplemento proteico. Esse ajuste visa promover o desenvolvimento ideal das abelhas, garantindo que haja recursos adequados disponíveis para o crescimento

saudável da colônia. Esse processo demonstra a capacidade das abelhas de regular suas atividades de forrageamento de acordo com as necessidades internas da colmeia, maximizando assim a eficiência na coleta de recursos. (Gray et al., 2019).

Ao longo de 22 semanas de coleta de pólen, a média semanal coletada foi de aproximadamente 61,48g por colmeia. Considerando que uma colmeia pode obter até 20kg de pólen por ano, o que equivale a cerca de 385g de pólen semanalmente (Campos et al., 2010), a quantidade obtida foi relativamente baixa. A coleta de pólen foi pequena desde os primeiros dias de coleta, indicando que durante o período de coleta havia baixa oferta deste recurso no campo (Vaudo et al., 2015).

Apesar da escassez de recursos, as abelhas submetidas à restrição alimentar (R) mantiveram um comportamento ativo de coleta de pólen, evidenciando a resiliência desses insetos e sua capacidade de buscar recursos mesmo em condições adversas. No entanto, observou-se uma variação no padrão de forrageamento entre as colmeias, com uma amplitude de até 12g de pólen coletado por semana, indicando que o estresse nutricional afetou algumas colmeias mais do que outras. A restrição alimentar desencadeia o fenômeno conhecido como estresse alimentar, resultando em um enfraquecimento significativo das colônias, o que está diretamente relacionado à sua saúde e vitalidade. Esse enfraquecimento é principalmente atribuído à indução de forrageamento precoce, um comportamento que está associado à diminuição da longevidade das abelhas operárias (Corona et al., 2023).

Nesse estudo, a eficiência dos coletores de pólen foi estimada em 67,6%, valor próximo encontrado em outros estudos, como o de Reis (2000) e Milfort (2020), que sugerem que um bom coletor de pólen deve apresentar eficiência entre 59 e 70%, apresentando variação por conta principalmente da granulometria dos pellets formados pelas abelhas que pode variar por colmeia.

3.2 Peso ao emergir das abelhas

O peso ao nascer das abelhas pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo a dieta. Em estudos recentes, observou-se que o peso médio ao nascer das

abelhas variou entre cerca de 90 e 96 mg, dependendo do grupo alimentar analisado. Esses valores estão dentro da faixa de peso esperada para abelhas recém-nascidas, que geralmente varia entre 81 e 151 mg. Esses achados destacam a importância da nutrição adequada durante o desenvolvimento das abelhas e fornecem insights sobre como diferentes dietas podem afetar o peso ao nascer desses insetos. (Scheiner, 2012).

A diferença de peso observada nos dois grupos alimentares desse estudo, sendo o grupo suplementado favorecido por sua alimentação abundante e o grupo com alimentação reduzida prejudicado emergindo com menor peso, corrobora com outros estudos que determinam que o peso inicial é influenciado pela quantidade e qualidade do alimento que as abelhas recebem durante a fase larval, impactando futuramente na resistência do sistema imunológico e na longevidade das abelhas na fase adulta (Ihle et al., 2014).

3.3 Consumo de pasta proteica e xarope com própolis

Estudos anteriores, como o de Couto e Couto (2006), destacam que as abelhas no estágio de nutriz têm uma demanda proteica significativamente maior, especialmente para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas. Em uma pesquisa mencionada nesse estudo, as abelhas que passaram pela fase de cria em colônias com diferentes abordagens nutricionais - seja com suplementação ou restrição alimentar - foram observadas consumindo, em média, cerca de 4 mg/abelha de pólen diariamente no grupo com suplementação, enquanto no grupo com restrição alimentar, o consumo médio foi de aproximadamente 2,8 mg/abelha diariamente. Esses resultados evidenciam a importância da disponibilidade adequada de pólen na dieta das abelhas nutrizas para atender às suas demandas metabólicas e fisiológicas durante esse estágio crucial de desenvolvimento. Crailsheim et al. (1992) sugere que as abelhas nutrizas devem consumir em média 3,9 mg/abelha de pólen por dia. Dessa forma, pode-se observar que as abelhas que tiveram origem em colmeias com redução alimentar, consumiram uma quantidade de pólen melhor do que o esperado,

sugerindo que a restrição alimentar na fase de cria prejudica o desenvolvimento da abelha na fase adulta e que as abelhas não apresentam o comportamento de ganho compensatório no consumo de alimento em fase adulta para compensar a sua falta durante a fase de cria.

O consumo de pólen contaminado foi notavelmente reduzido em tratamentos nos quais ocorreu contaminação com fungicida, chegando a ser inferior a 2 mg/abelha de pólen diário. Essa redução no consumo de pólen contaminado também foi observada em outros estudos, como o realizado por DeGrandi-Hoffman (2017). Nesse estudo, doses subletais do fungicida Pristine® (Boscalida e Piraclostrobina) foram utilizadas na alimentação das abelhas, resultando em uma diminuição do consumo de pólen, com uma intensificação desse efeito observada com doses mais altas de fungicida. Além disso, há evidências de que a diminuição no consumo de pólen contaminado pode ser atribuída à redução da palatabilidade do pólen contaminado por fungicidas, conforme relatado em estudos anteriores (DeGrandi-Hoffman et al., 2015; Campbell et al., 2016).

Neste estudo, foi constatado que as abelhas que se alimentaram de xarope sem própolis consumiram mais pasta proteica do que aquelas que tinham própolis em sua concentração, independentemente do tratamento nutricional ou da contaminação por fungicida. Essa redução no consumo do xarope pode ser atribuída à ausência do comportamento natural das abelhas de ingerir própolis, principalmente devido à sua toxicidade para as abelhas, conforme demonstrado anteriormente (Damiani, 2017). Isso contraria a hipótese de que as abelhas desafiadas poderiam consumir própolis em quantidades moderadas como uma forma de automedicação.

Mura et al. (2020) reforçam essa falta de sustentação, pois, ao desafiar abelhas com nosemose e oferecer própolis em sua dieta, não foi observada preferência das abelhas pelo alimento com própolis como uma possível automedicação. No entanto, ao contrário deste estudo, as abelhas desafiadas em sua pesquisa não mostraram diferença no consumo em comparação ao grupo de controle, talvez pelo modo de fornecimento e das concentrações utilizadas em cada estudo. Em contraposição, Simone-Finstrom e Spivak (2012) sugerem que as abelhas desafiadas com um fungo

parasita (*Ascophaera apis*) conhecido como cria giz podem usar a própolis como forma de automedicação.

Por outro lado, é crucial considerar que tanto o estudo atual quanto o estudo conduzido por Mura et al. (2020) foram realizados em ambiente laboratorial e focalizaram na avaliação dos benefícios do uso de própolis em nível individual. Em contraste, o estudo de Simone-Finstrom e Spivak (2012) foi realizado em um apiário, em condições de campo, avaliando-se os benefícios da própolis em nível de colônia. Essa distinção de contexto pode influenciar os resultados e as conclusões obtidas em cada pesquisa, destacando a importância de considerar o ambiente em que os estudos foram conduzidos ao interpretar seus resultados. Essa diferenciação entre os ambientes laboratorial e de campo ressalta a complexidade das interações entre as abelhas e seu ambiente, indicando a necessidade de investigações adicionais para compreender completamente os efeitos do uso de própolis tanto em nível individual quanto em nível de colônia.

3.4 Avaliação dos níveis de proteína na hemolinfa

A avaliação dos níveis de proteína na hemolinfa das abelhas ao emergir oferece uma maneira precisa e eficiente de monitorar o estado nutricional das colônias ou a qualidade dos alimentos. Essa análise pode ser conduzida com pequenos grupos de abelhas das colmeias do apiário. No contexto deste estudo, os resultados confirmaram a hipótese de que colônias com alimentação reduzida produzem abelhas com níveis mais baixos de proteína na hemolinfa em comparação com as abelhas de colmeias com alimentação suplementada. Essa disparidade causada pela nutrição também foi observada no estudo de Cremonez et al. (1998), no qual abelhas submetidas a dietas com diferentes fontes proteicas apresentaram variações nos níveis de proteína em suas hemolinfas.

A análise do teor de hemolinfa realizada no sétimo dia (D7) revelou uma diferença significativa nos níveis proteicos das abelhas que receberam pasta proteica com fungicida em comparação com aquelas que receberam sem fungicida. Isso

sugere que o fungicida prejudica tanto a quantidade quanto o armazenamento de proteínas no organismo das abelhas. Os baixos níveis de proteínas na hemolinfa estão diretamente relacionados à capacidade das abelhas de sustentar o crescimento da colônia. Isso afeta a produção de zangões e crias, podendo resultar na diminuição e até mesmo na morte da colônia (Herbert, 1992). Os valores de proteínas encontrados no D7 em abelhas que receberam pólen sem contaminação por fungicidas, independentemente da suplementação com própolis no xarope, foram semelhantes aos encontrados por Cremonez et al. (1998) em dietas à base de pólen apícola, o que reforça os resultados obtidos neste estudo.

3.5 Expressão de genes do sistema imunológico, metabolismo oxidante e detoxificação

A compreensão da expressão genética nas abelhas pode revelar como os agrotóxicos e outros produtos químicos afetam esses insetos em um nível molecular. Neste estudo, genes relacionados ao estresse oxidativo e detoxificação (CAT, MnSOD, CuZnSOD, GST-1 e CYP3061), nutrição e longevidade (Vitelogenina e Hexamerina), e imunidade (Defensina-1, Abaecina, Hymenoptaecina e Apidaecina) foram analisados para uma melhor compreensão desses efeitos.

O metabolismo aeróbico das abelhas produz espécies reativas de oxigênio (ERO). Quando essas espécies são geradas em excesso e não são neutralizadas pelo sistema antioxidante do organismo, elas podem se acumular, causando danos oxidativos aos componentes celulares. Isso pode resultar em envelhecimento precoce e tornar as abelhas mais vulneráveis a doenças e patógenos (Perez-Campo et al., 1998). A primeira linha de defesa das abelhas contra os ROS as enzimas superóxido dismutase (MnSOD e CuZnSOD), Catalase (CAT) e Peroxidases (GST-1), suas atividades foram determinadas em frações pós-mitocondriais de tecidos, em plasma de hemolinfa e no sêmen de abelhas (Comhair, 2005). A baixa concentração de campo de dimertachlona, procloraz e iprodiona pode induzir as atividades da catalase (CAT), carboxilesterases (CarE) e glutathione S-transferase (GSTs), mas altas concentrações inibem sua atividade (Duan et al., 2020). A iprodiona (2 mg/kg) não foi

letal para abelhas recém-emergidas, mas pode inibir a síntese de glutathione, levando à geração de espécies reativas de oxigênio, e as células das abelhas tratadas apresentaram sinais de apoptose (Carneiro et al., 2019).

Observou-se neste estudo que o tratamento contendo apenas pólen contaminado causou uma maior expressão nos genes CAT, MnSOD e CuZnSOD em abelhas com melhor estado nutricional, enquanto o gene GST-1 apresentou uma menor expressão em contraste. Por outro lado, no tratamento com fungicida e própolis, os genes mostraram uma sub-regulação, sugerindo que a combinação de ambos os componentes pode ter melhorado a ativação desses genes para desempenhar suas funções. Na dieta contendo apenas própolis, todos os genes demonstraram uma expressão significativa, especialmente no grupo que se desenvolveu em colônias suplementadas, indicando que a própolis causa uma forte ativação desses genes. Isso pode representar um ônus para as abelhas devido à energia adicional necessária para regular os genes. Além disso, verificou-se que as colônias suplementadas (S) têm mais energia disponível para essa regulação. O estudo de Sunkesula e Reddy (2022), demonstra através desses mesmos genes que abelhas manejadas têm uma maior tendência de apresentar estresse oxidativo em relação a abelhas encontradas em meio selvagem ao serem desafiadas por estressantes.

O grupo de Monooxigenases do citocromo P450 é composto por 46 genes cuja função principal é a desintoxicação de fitoquímicos encontrados no mel e pólen, micotoxinas, bem como pesticidas piretróides e acaricidas presentes na colmeia. Em um estudo realizado por Mao et al. (2017), testou-se os efeitos do fungicida triázol miclobutanil no metabolismo do fitoquímico quercetina, observando-se uma menor metabolização da quercetina e uma diminuição na produção de ATP torácica, que é uma fonte de energia para o voo, indicando que o fungicida apresentou um efeito inibidor sobre o gene. Nesse estudo, o gene CYP3061 mostrou resultados contraditórios: teve maior expressão em abelhas suplementadas tratadas com pólen contaminado, mas essas mesmas abelhas apresentaram menor expressão nos tratamentos que continham própolis, sugerindo que a própolis prejudicou a regulação desse gene, mas sem a presença desse componente, o gene conseguiu regular-se

positivamente. Por outro lado, o grupo alimentar que teve alimentação reduzida apresentou maior expressão nos tratamentos que incluíam própolis, mas o gene não teve diferença em sua regulação em relação ao grupo controle, indicando que a própolis tem a capacidade de ativar esse gene em abelhas com baixo nível nutricional, o que pode ser considerado uma reação negativa devido ao gasto de energia adicional.

A vitelogenina e a hexamerina são gene pleiotrópicos, ou seja, apresentam mais de uma função no organismo das abelhas, mas são geralmente ligadas as suas funções nutricionais de síntese e armazenamento de proteínas. Xiong et al. (2023) observou que fungicidas como a piraclostrobina causa a diminuição do metabolismo de nutrientes e também afeta a competência imunológica de abelhas durante seu desenvolvimento larval. Christen et al (2019) observaram que a contaminação com o fungicida clorotanolina em diferentes épocas causou uma menor expressão da vitelogenina, da mesma maneira que foi observado neste estudo para o grupo das abelhas suplementadas nos tratamentos com pólen contaminado em ambos os genes.

Christen et al (2019) também estudaram os efeitos da clorotanolina sobre os genes de imunidade utilizados neste estudo, que apresentaram infra e supra regulações dependendo da estação na qual as abelhas foram contaminadas. Nesse estudo, podemos observar uma menor expressão das abelhas de ambos os tratamentos com pólen contaminado com fungicida de todos os genes, pode-se observar uma inibição de todos esses genes independente do tratamento alimentar recebido durante o desenvolvimento da abelha, com exceção do grupo R do tratamento F+P+ que apresentou maior expressão.

A adição de própolis ao xarope não impediu a mitigação dos efeitos causados pelo fungicida avaliado. Por mais que a própolis seja importante para a saúde das abelhas, não está claro por meio deste estudo e de alguns outros (Mura et al., 2020; Naree et al., 2021), que a administração de própolis por meio do xarope é um método adequado de disponibilizar esse material para as abelhas. No entanto, Garcia et al. (2024) sugerem que a adição dos fitoquímicos rutina, ácido p-cumárico e kaempferol na dieta energética de abelhas operárias pode oferecer proteção contra os efeitos negativos causados ao sistema das abelhas pelo inseticida fipronil.

3.6 Longevidade das abelhas

No teste de longevidade realizado, ficou claro que as abelhas submetidas exclusivamente ao tratamento com fungicida (F+P-) apresentaram a menor taxa de sobrevida, o que está em linha com resultados de estudos anteriores, como os de Liao et al. (2017; 2020). No entanto, também foi observado que as abelhas que na fase de cria se desenvolveram em colônias que receberam suplementação nutricional e que na fase adulta receberam xarope com própolis e parta proteica com fungicida (F+P+) apresentaram uma maior sobrevida do que as abelhas desenvolvidas em colmeias com restrição alimentar. Liao et al. (2017; 2020) sugerem em suas pesquisas que os fitoquímicos naturais presentes nas dietas das abelhas podem mitigar os efeitos tóxicos dos pesticidas sobre a longevidade das abelhas contaminadas. Portanto, é possível hipotetizar que as abelhas desenvolvidas em colmeias com alimentação reduzida (R) tiveram menos acesso a esses fitoquímicos durante o desenvolvimento, tornando-as mais vulneráveis aos efeitos negativos dos fungicidas. Mesmo com a introdução da própolis, não houve aumento dessa resistência. No entanto, pode-se considerar que o grupo de abelhas criadas em colmeias com suplementação alimentar teve maior acesso aos fitoquímicos durante o desenvolvimento, tornando-as mais resistentes aos efeitos dos fungicidas, e a adição de própolis na fase adulta sustentou essa resistência.

Foi observado que apenas a adição de própolis à dieta, embora tenha causado uma certa diminuição na sobrevida, apresentou resultados mais próximos ao grupo controle. Essa descoberta está alinhada com os dados encontrados por Simone-Finstrom (2017), cujo estudo sugere que a própolis não mitiga os efeitos negativos de patógenos, mas também não traz efeitos negativos à sobrevida das abelhas quando introduzido em suas dietas.

4. Conclusão

A exposição ao fungicida teve um efeito negativo tanto no teor de proteína encontrado na hemolinfa quanto na sobrevivência das abelhas nutrízes, reduzindo significativamente seu tempo de vida.

O fungicida de tríplice ação Fox Xpro® causou alterações anormais na expressão de todos os genes estudados em abelhas nutrízes, independentemente da nutrição recebida durante o desenvolvimento na fase de cria.

Os genes relacionados à imunidade mostraram uma menor expressão, indicando que os componentes ativos do fungicida inibiram a resposta imune das abelhas, deixando-as mais vulneráveis a estressores externos. Os genes do metabolismo oxidativo e detoxificante também foram afetados, o que pode potencialmente comprometer seu funcionamento.

Embora a própolis administrada através da alimentação tenha causado uma expressão significativamente maior nos genes estudados, não foi capaz de mitigar os efeitos negativos causados pelo fungicida.

As abelhas suplementadas (S) durante a fase de cria mostraram resultados superiores e mais favoráveis em comparação com as abelhas que tiveram alimentação restrita (R) em todos os testes realizados. Elas apresentaram menores alterações nos genes, maior sobrevivência e teor mais alto de proteínas na hemolinfa.

Referências

AIZEN, M. A.; AGUIAR, S.; BIESMEIJER, J.C.; GARIBALDI, L. A.; INOUE, D. W.; JUNG, C.; MARTINS, D. J.; MEDEL, R.; MORALES, C. L.; HGO, 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.

AIZEN, M. A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Current biology**, v. 18, n. 20, p. 1572-1575, 2008.

ALAUX, C., DUCLOZ, F., CRAUSER, D., LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology letters**, v. 6, n. 4, p. 562-565, 2010.

análises físico-químicas do pólen coletado. 2000. Dissertação (Mestrado em

AOAC. Official Methods of Analysis. 15. ed. **Washington: Association of OfficialAnalytical Chemist**, 1298p, 1990.

BAYER. Fox Xpro: Fungicida. São Paulo (SP): Bayer S. A.; 2019. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-docampo/protecaodecultivos/fox-xpro>>.

BERENBAUM M. R.; CALLA B. Honey as a Functional Food for Apis mellifera. Annu Rev Entomol. 2021 Jan 7;66:185-208. doi: 10.1146/annurev-ento-040320-074933. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32806934.

BORSUK, G.; PTASZYNSKA, A. A.; OLSZEWSKI, K.; DOMACIUK, M.; KRUTMUANG, P.; PALEOLOG, J. A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170487, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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

CAMPBELL, J. B.; NATH, R.; GADAU, J.; FOX, T; DEGRANDI-HOFFMAN, G; FARRISON, J.F. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of insect physiology*, v. 86, p. 11-16, 2016.

CAMPOS, M. G. R.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; BOGDANOV, S. What is the future of Bee-Pollen. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 2, n. 4, p. 131-144, 2010.

CANTARELLA H.; MATTOS Jr. D.; BOARETTO R. M.; QUAGGIO J. A.; RAIJ B. V. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo (2ª ed.). **Instituto Agronômico**, Campinas, 2022.

CARNEIRO, L. S.; MARTINEZ, L. C.; GONÇALVES, W. G.; SANTANA, L. M.; SERRÃO, J. E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 189, p. 109991, 2020.

CHRISTEN, V.; KREBS, J.; FENT, K. Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. **Journal of hazardous materials**, v. 377, p. 215-226, 2019.

COMHAIR, S. A.; XU, W.; GHOSH, S.; THUNNISSEN, F. B.; ALMASAN, A.; CALHOUN, W. J.; JANOSHA, A. J.; ZHENG, L.; HAZEN, S. L.; ERZURUM, S. C. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 3, p. 663-674, 2005.

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.

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

DAMIANI, N.; PORRINI, M. P.; LANCIA J. P.; ALVAREZ E.; GARRIDO. P. M.; DOMINGUEZ, E.; EGUARAS, M. J. Effect of propolis oral intake on physiological condition of young worker honey bees, *Apis mellifera* L. Journal of apicultural science, v. 61, n. 2, p. 193-202, 2017.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; WATKINGS 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, n. 6, p. 2518-2528, 2015.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CORBY-HARRIS, V.; DEJONG, E. W; CHAMBERS M, HIDALGO, G. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, v. 48, p. 340-352, 2017.

DUAN X. L.; XIONG M. Q.; LIU W. B.; ZHAO B. A.; HUANG S. K.; LI J. H. Effects of three fungicides on the activities of protective enzymes and detoxifying enzymes in *Apis mellifera*. *Acta pratac. Sin.* 29 (11), 74–82, 2020.
Entomologia) – **ESALQ/USP, Piracicaba**, 2001.

FAVARO, R.; BAUER, L. M.; ROSSI, M.; D'AMBROSIO, L.; BUCHER, E.; ANGELI, S. Botanical origin of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees during and after apple bloom. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 458569, 2019.

GRASSL, J.; HOLT, S.; CREMEN, N.; HAHNE, D.; BAER, B. Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 159, p. 78-86, 2018.

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.

HERBERT, E. W. Honey bee nutrition, 197–233. **The hive and the honey bee**. Dadant, Hamilton, IL, 1992.

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**, v. 25, n. 4, p. 683-694, 2021.

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.

JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity–USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

KIM, S.; CHEN J.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; BOLTON, E. PubChem 2023 update. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D1373-D1380, 2023.

LIAO, L.; PEARLSTEIN, D. J.; WU W. Y.; KELLEY, A. G.; MONTAG, W. M.; HSIEH, E. M.; BARENBAUM, M. R. Increase in longevity and amelioration of pesticide toxicity by natural levels of dietary phytochemicals in the honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS one**, v. 15, n. 12, p. e0243364, 2020.

LIAO, L.; WU, W. Y.; BERENBAUM, M. R. Impacts of dietary phytochemicals in the presence and absence of pesticides on longevity of honey bees (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 8, n. 1, p. 22, 2017.

LOURENÇO, A. P.; MACKERT, A.; DOS SANTOS, A. C.; SIMÕES, Z. L. P. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie**, v. 39, n. 3, p. 372-385, 2008.

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.

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

MURA, A.; PUSCEDDU, M.; THEODOROU, P.; ANGIONI, A.; FLORIS, I.; PAXTON, R. J.; SATTA, A. Propolis consumption reduces *Nosema ceranae* infection of European honey bees (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 11, n. 2, p. 124, 2020.

NUREE, S.; ELLIS, J. D.; BENBOW, M. E.; SUWANNAPONG, G. The use of propolis for preventing and treating *Nosema ceranae* infection in western honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1787) workers. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 686-696, 2021.

OECD (1998), Test Guideline 213: Honey bee, Acute Oral Toxicity Test, Section 2; Effects on Biotic Systems, OECD, Paris; doi: 10.1787/9789264070165-en.

PEREZ-CAMPO, R.; LOPEZ-TORRES, M.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; BARJA, G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, p. 149-158, 1998.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

R Core Team (2024). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <https://www.R-project.org/>.

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

REBOUÇAS, E. L.; COSTA, J. J. D. N.; PASSOS, M. J.; PASSOS, J. R. D. R.; HURK, R. V. D.; SILVA, J. R. V. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 143-154, 2013.

REIS, V. D. A. Fatores que influenciam na coleta de pólen por *Apis mellífera* L. e RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022.

SAS Institute Inc. (2024). SAS OnDemand for Academics (Versão 9.4) [Software]. Disponível em https://www.sas.com/pt_br/software/on-demand-for-academics.html

SCHEINER, R. Birth weight and sucrose responsiveness predict cognitive skills of honeybee foragers. **Animal Behaviour**, v. 84, n. 2, p. 305-308, 2012.

SIEDE, R.; MEIXNER, M. D.; BÜCHLER, R. Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 4, p. 320-328, 2012.

SIMONE, M.; EVANS, J. D.; SPIVAK, M. Resin collection and social immunity in honey bees. **Evolution**, v. 63, n. 11, p. 3016-3022, 2009.

SIMONE-FINSTROM, M. D.; SPIVAK, M. Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees?. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34601, 2012.

SIMONE-FINSTROM, M.; BORBA, R. S.; WILSON, M. SPIVAK, M. Propolis counteracts some threats to honey bee health. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 46, 2017.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295-311, 2010.

SUNKESULA, M. S. B.; REDDY, M. S. Validation of Antioxidant and Immune Related Gene Members among *Apis cerana* Species of South India by Quantitative Real-Time PCR. **Journal of Apiculture**, v. 37, n. 2, p. 101-112, 2022.

TURCATTO, A. P.; LOURENÇO, A. P.; DE JONG, D. Propolis consumption ramps up the immune response in honey bees infected with bacteria. **Apidologie**, v. 49, n. 3, p. 287-296, 2018.

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.

XIONG, M.; QIN, G.; WANG, L.; WANG, R.; ZHOU, R.; LUO, X.; LOU, Q.; HUANG, S.; LI, J.; DUAN, X. Field recommended concentrations of pyraclostrobin exposure disturb

the development and immune response of worker bees (*Apis mellifera* L.) larvae and pupae. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1137264, 2023.

ZUBROD, J. P.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRÜHL, C. A.; IMFELD, G.; KNÄBEL, A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J. J.; ROHR, J.; SCHARMÜLLER, A.; SMALLING, K.; STEHLE, S.; SCHULZ, R.; SCHÄFER, R. B. Fungicides: an overlooked pesticide class?. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 2019.