

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

EFEITO DO INSETICIDA FIPRONIL EM ABELHAS
AFRICANIZADAS E NA EXPRESSÃO DE GENE RELACIONADO AO
SISTEMA IMUNOLÓGICO

RODRIGO ZALUSKI

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

BOTUCATU-SP

Junho - 2014

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

EFEITO DO INSETICIDA FIPRONIL EM ABELHAS
AFRICANIZADAS E NA EXPRESSÃO DE GENE RELACIONADO AO
SISTEMA IMUNOLÓGICO

RODRIGO ZALUSKI
Biólogo

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

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

BOTUCATU-SP
Junho – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Zaluski, Rodrigo.

Efeito do inseticida fipronil em abelhas africanizadas e na expressão de gene relacionado ao sistema imunológico : toxicidade do inseticida fipronil para abelhas / Rodrigo Zaluski. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Capes: 50405004

1. Abelha-africana. 2. Inseticidas. 3. Expressão gênica. 4. Toxicidade - Testes. 5. Imunologia molecular.

Palavras-chave: Apis mellifera ; Doses letais e subletais; Expressão gênica; Fenilpirazois; Toxicidade.

DEDICO

Aos meus pais, Sérgio Renato Zaluski e Júlia Zaluski, pessoas muito especiais, pelas quais eu agradeço a Deus todos os dias. Pessoas que me educaram e ensinaram a valorizar cada oportunidade, que nunca mediram esforços para me auxiliar a conquistar cada sonho.

Aos meus avós, Natália Danelichen Zaluski e Gregório Zaluski (*in memoriam*) e ao meu irmão Rafael Zaluski pelo apoio e incentivo em cada momento.

Ao grande amigo e professor, Ernesto Dietrich Hartmut Breyer, que sempre me incentivou e me fez descobrir o “Fantástico mundo das abelhas”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por todas as graças e conquistas, por colocar as pessoas certas em meu caminho, que me ajudaram a conquistar este título.

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

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla pela co-orientação, pelos ensinamentos, oportunidades, disponibilidades de equipamentos e conhecimentos na área de genética molecular.

Ao Ms. Samir Moura Kadri e Dr. Diego Peres Alonso, pela ajuda nos estudos de expressão gênica, ensinamento na área de genética molecular e pela total dedicação a esta pesquisa.

À Ms. Thaís de Sousa Bovi, pela ajuda nos testes de toxicidade, incentivo e amizade.

Aos amigos de Pós-graduação, Melina Stoian Modanesi, Adriana Fava Negrão, Renata Leonardo Lomele, Cinthia Rio Branco e Edison Antônio de Souza, pelo companheirismo e amizade ao longo desta etapa.

Aos amigos da República D.N.A., pela amizade e pelos momentos de descontração, em especial Gilson Stanski, Junior Decarli e Guilherme Arruda.

Aos professores da Faculdade Estadual de Filosofia Ciência e Letras de União da Vitória – FAFIUV – UNESPAR, pela dedicação e ensinamentos durante a graduação.

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

Aos professores Dra. Margarida Maria Barros, Dr. Nabor Veiga e Dr. Daniel Nicodemo pelas críticas e sugestões que enriqueceram o presente trabalho.

À Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação do Câmpus de Botucatu, especialmente a Rosemary Cristina da Silva pelo auxílio prestado na conferência das referências.

Aos secretários (as) da seção de pós-graduação Seila Cristina Cassineli Vieira, Ellen Cassemiro Guilhen e Carlos Pazzani Júnior; ao secretário do Departamento de Produção Animal Renato Agostinho Arruda, pela atenção e orientações nas questões burocráticas.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	01
Considerações Iniciais.....	02
1. Origem, biologia e importância das abelhas melíferas.....	02
2. Impacto da utilização de agrotóxicos para abelhas melíferas.....	05
2.1. Impacto da utilização de inseticidas para abelhas melíferas.....	07
2.2. Efeitos de agrotóxicos na expressão de genes do sistema imunológico em abelhas e uso da PCR no seu estudo.....	12
Referências.....	16
CAPÍTULO II.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1. Introdução.....	29
2. Metodologia.....	31
2.1. Local do experimento.....	31
2.2. Testes de toxicidade.....	31
2.3. Avaliação de alterações motoras.....	33
2.4. Teste de campo - efeito de DS do fipronil em colônias de <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	33
2.5. Expressão do gene defensina 1 em abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas em campo a DS de fipronil.....	34
2.6. Análises estatísticas.....	36
3. Resultados.....	36
4. Discussão.....	40
Referências.....	45
CAPÍTULO III.....	51
Implicações.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo da expressão gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas à dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).....	35
Tabela 2. Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas para percorrer 50 cm após exposição por ingestão ou contato com a DL_{50} do inseticida fipronil, nos tempos 1, 4 e 24 horas.....	37
Tabela 3. Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas para percorrer 50 cm após exposição por ingestão ou contato com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil, nos tempos 1, 4 e 24 horas.....	38
Tabela 4. Médias e desvio padrão da viabilidade de cria (%) de enxames de <i>Apis mellifera</i> africanizadas que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).....	38
Tabela 5. Médias e desvio padrão das áreas de postura, cria aberta e cria fechada (cm^2) de enxames de <i>Apis mellifera</i> africanizadas que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).....	39
Tabela 6. Médias e desvio padrão da quantificação relativa do gene defensina I em <i>Apis mellifera</i> africanizadas coletadas em colônias que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Página
Figura 1. Ensaio de toxicidade aguda de <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas a doses do fipronil para cálculo da DL_{50} . A. Exposição por ingestão; B. Exposição por contato.....	37

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Origem, biologia e importância das abelhas melíferas

Há cerca de 30 milhões de anos iniciava-se a evolução de um grupo de vespas que deixaram de ser predadoras, substituindo a proteína animal de sua dieta, pela proteína vegetal. Desse grupo de vespas se originaram as abelhas, que se tornaram especialistas na polinização das plantas angiospermas, devido à coleta de pólen e néctar produzidos por essas plantas (DANFORTH et al., 2006).

Atualmente, em torno de 75% das espécies vegetais existentes no planeta são dependentes de agentes polinizadores, os quais garantem o transporte do pólen e a fecundação das plantas, garantindo a produção dos frutos e perpetuação das espécies (NABHAN; BUCHMANN, 1997). As abelhas são os principais polinizadores, responsáveis por garantir a reprodução cruzada de 73% das principais espécies vegetais cultivadas no mundo (RICKETTS et al., 2008).

A principal espécie de abelha utilizada na produção apícola e em serviços de polinização de cultivos agrícolas é a *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). As abelhas do gênero *Apis* evoluíram na África e iniciaram sua migração para Ásia e Europa, diferenciando-se em subespécies com diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (PARKER et al., 2010). Essas abelhas apresentam ampla distribuição mundial, devido a sua dispersão natural e introduções realizadas pelo homem. Além da sua adaptação ao manejo, que permitiu o gradual desenvolvimento e aperfeiçoamento da apicultura, as abelhas melíferas apresentam alta produtividade, generalidade e fidelidade na polinização de cultivos agrícolas e vegetação nativa (WHITFIELD et al., 2006; FREITAS; PINHEIRO, 2012).

No Brasil, a primeira introdução de abelhas europeias da subespécie *A. mellifera mellifera* (abelhas pretas) foi realizada em 1839, quando colônias foram trazidas para o Rio de Janeiro. Posteriormente, foram introduzidas no Sul do país, abelhas *A. m. ligustica* e *A. m. carnica* (CRANE, 1999). Em 1956, foram importadas abelhas rainhas africanas (*A. m. scutellata*), com o objetivo de aumentar a produtividade das colmeias, devido à baixa produtividade das abelhas europeias, que não se adaptaram bem à região Neotropical. Em 1957, vinte e seis enxames de abelhas africanas escaparam e iniciou-se

o processo de cruzamentos com as subespécies europeias, dando origem ao híbrido fértil chamado abelha africanizada (PEREIRA; CHAUD-NETTO, 2005; PINTO et al., 2005). Este híbrido se adaptou às condições climáticas e florísticas encontradas nas Américas, possibilitando o desenvolvimento tecnológico e produtivo da apicultura.

Geralmente, um enxame de abelhas *A. mellifera* em períodos de grandes floradas pode ser constituído, em média, por 60.000 a 70.000 abelhas, onde são encontradas três castas, representadas por uma única rainha, de zero a algumas centenas de zangões, dependendo da época do ano e milhares de abelhas operárias (HICKMAN et al., 2010).

As três castas de abelhas apresentam um nível extraordinário de organização. Cabe a abelha rainha a manutenção da coesão do enxame por meio da produção de feromônios, a cópula em média com 12 zangões durante o voo nupcial e a postura diária de milhares de ovos, garantindo a perpetuação da colônia. Os ovos fertilizados podem dar origem a novas fêmeas operárias ou rainhas, dependendo da alimentação e das dimensões do alvéolo em que se desenvolvem e os não fertilizados, se desenvolvem por partenogênese arrenótoca, originando os zangões. O zangão é o responsável por fecundar a abelha rainha (HICKMAN et al., 2010).

As abelhas operárias são responsáveis pela realização de todas as demais atividades da colônia, sendo que suas funções variam de acordo com a idade fisiológica. Do 1º ao 3º dia de vida trabalham na limpeza de qualquer sujidade que exista dentro da colmeia. Do 4º ao 12º dia alimentam as larvas, produzem geleia real e alimentam a rainha. Do 13º ao 18º dia produzem cera e constroem os favos. Do 19º ao 20º dia ficam de guarda no alvado, defendendo seu território contra qualquer predador. E, finalmente, do 21º dia em diante, as abelhas operárias fazem os serviços externos no campo, sendo então denominadas abelhas campeiras, quando colhem resinas, pólen, néctar e água (HICKMAN et al., 2010).

O desenvolvimento de todos os indivíduos da colônia compreende os estágios de ovo, larva e pupa. Todas as castas permanecem três dias na fase de ovo e seis dias na fase de larva. Já a fase de pupa varia em função da casta e também da subespécie de abelha, durando em média, sete dias para rainha, quinze dias para os zangões e doze dias para as operárias. Dessa forma, a rainha, zangões e operárias levam em média, respectivamente, 16, 24 e 21 dias para completar seu desenvolvimento, desde o ovo até o nascimento (PAGE; PENG, 2001).

A abelha rainha vive, em média, um ano em colmeias comerciais (onde é substituída pelos apicultores) a fim de garantir boa produção, já que nesse período apresenta maior taxa de postura de ovos e produção de feromônios. Em colmeias encontradas na natureza, onde a substituição da rainha ocorre de forma natural, a rainha pode viver até cinco anos. Os zangões vivem, em média, 40 dias na primavera e no verão, os únicos momentos em que são criados, ou, até a cópula com a rainha, quando morrem devido à perda de parte de seu aparelho genital que fica preso na câmara do ferrão da rainha, provocando a ruptura de tecidos e perda de hemolinfa. As abelhas operárias vivem em média três a seis semanas na primavera e no verão, podendo viver cerca de quatro meses durante o inverno (PAGE; PENG, 2001).

A criação e exploração racional de abelhas melíferas em colmeias deu origem à apicultura, atividade de importância para geração de emprego e renda, que permite a obtenção de produtos apícolas com valor nutricional, farmacêutico e cosmético (FREITAS; PINHEIRO, 2012). Além do mel, que é o principal produto apícola comercializado pela maioria dos apicultores, também podem ser produzidos pólen, própolis, geleia real, cera e apitoxina (veneno). Entretanto, está na polinização a principal importância das abelhas, sendo o valor dos serviços de polinização, considerando apenas os cultivos utilizados diretamente na alimentação humana, de aproximadamente 216 bilhões de dólares anuais (GALLAI et al., 2009).

A crescente população mundial, dependente da produção cada vez maior de alimentos, torna evidente a importância e necessidade da preservação dos polinizadores. Entretanto, a densidade populacional dos principais insetos polinizadores, representados pelas abelhas, vem sendo reduzida em níveis que podem comprometer os serviços de polinização nos ecossistemas naturais e agrícolas, prejudicando a capacidade reprodutiva das plantas (KREMEN, et al., 2007).

Dentre as várias causas responsáveis pelo declínio de polinizadores, destaca-se o desmatamento de áreas com vegetação nativa para a expansão da pecuária, implantação e/ou expansão de cidades ou áreas agrícolas; mudanças climáticas; aparecimento e disseminação de doenças e parasitas; e o uso excessivo de agrotóxicos em cultivos agrícolas (FLETCHER; BARNETT, 2003; FREITAS; PINHEIRO, 2010). O uso de agrotóxicos em monoculturas vem selecionando indivíduos que se tornam resistentes aos princípios ativos utilizados, fazendo com que suas populações aumentem. O

desenvolvimento de populações de pragas resistentes aos agrotóxicos frequentemente utilizados em seu combate vem tornando frequente a utilização de produtos mais tóxicos, que são altamente nocivos ao ambiente e aos polinizadores (PEREIRA, 2010).

2. Impacto da utilização de agrotóxicos para abelhas melíferas

Os agrotóxicos são substâncias químicas destinadas controlar, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico ou de vida animal ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais úteis, seus produtos ou subprodutos e ao homem (PERES et al., 2003).

A utilização de agrotóxicos é importante para o combate de pragas, doenças e plantas daninhas em culturas agrícolas; porém, oferece riscos à saúde humana e ao ambiente. O uso de agrotóxicos vem aumentando mundialmente, trazendo prejuízos a biodiversidade (CONNOLLY, 2013). Na condição de importante produtor agrícola, o Brasil também vem aumentando sua área de cultivo anualmente, sendo que na safra 2012/2013 foram cultivados 53,27 milhões de hectares, com produção de 186,86 milhões de toneladas de grãos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013). Entretanto, apesar da expressiva produção, a venda e utilização de agrotóxicos aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012, estando os herbicidas, inseticidas e fungicidas entre os produtos mais utilizados (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA, 2012).

Desde 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos, quando, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – foram lançadas 673,9 mil toneladas de produtos ativos no ambiente. Em 2011, o consumo atingiu 853 mil toneladas, representando média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (CARNEIRO et al., 2012). Na safra 2012/2013, o Brasil utilizou cerca de um bilhão de litros de agrotóxicos (EMATER-RS, 2014).

A crescente utilização de agrotóxicos em cultivos agrícolas é preocupante devido à contaminação ambiental, que resulta em altas concentrações de resíduos encontrados em alimentos, aumento no número de doenças associadas a essas

substâncias e na biomagnificação desses produtos nas teias alimentares (BASSIL et al., 2007).

Os agrotóxicos representam fonte direta de contaminação para todos os seres vivos, incluindo os polinizadores, que dependem da vegetação e ambiente para obtenção de néctar, pólen, resinas e água para sua sobrevivência. A exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre por meio de contato direto ou pela ingestão de recursos contaminados. Isso resulta na contaminação dos produtos apícolas e em perturbações na colônia, que muitas vezes podem ser fatais (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

No inverno de 2006/2007 foi descrita nos Estados Unidos, uma síndrome caracterizada pelo agravamento da perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou proximidades da colmeia e abandono das crias e alimento no ninho. Essa síndrome foi denominada de CCD (Colony Collapse Disorder) ou Distúrbio de Colapso das Colônias acarretando nesse período, a perda média de 45% das colmeias nos EUA (COX-FOSTER et al., 2007; VAN ENGELSDORP et al., 2009). Anteriormente ao surgimento da CCD eram comuns perdas anuais de até 10% das colmeias, índice que pode ser considerado normal (OLDROYD, 2007). No entanto, a partir de 2006/2007, alguns países da Europa registraram perdas de até 50% dos seus enxames (CONTE et al., 2010). Nos Estados Unidos, durante o inverno de 2012-2013, a CCD ocasionou a perda de 31,1% das colmeias (KAPLAN, 2014).

As principais causas relacionadas ao aparecimento da CCD, que atualmente vêm sendo investigadas, incluem a radiação emitida por telefones celulares, cultivo de plantas geneticamente modificadas, disseminação de doenças causadas por vírus, microrganismos e parasitas, mudanças climáticas, destruição da flora nativa, nutrição inadequada e uso indiscriminado de agrotóxicos, sendo essa última explicação a que mais se destacou nos últimos anos (RATNIEKS; CARRECK, 2010).

A toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas é determinada por meio da DL_{50} , definida como a dose letal capaz de ocasionar a mortalidade de 50% de uma população em um período de 24 ou 48 horas (PEREIRA, 2010). Segundo Johansen e Mayer (1990), os agrotóxicos que apresentam DL_{50} inferior a $2\mu\text{g/abelha}$ são considerados altamente tóxicos às abelhas *A. mellifera*. Quando os recursos coletados pelas abelhas apresentam concentrações de agrotóxicos superiores ou iguais a DL_{50} , ocorre à contaminação aguda das abelhas, o que provoca sua mortalidade em curto espaço de

tempo. Já as pequenas doses, inferiores a DL_{50} , conhecidas como subletais, podem ser levadas às colmeias, desencadeando mudanças fisiológicas e comportamentais nas abelhas, comprometendo o bem-estar, produtividade e a manutenção das colônias (MIRANDA et al., 2003). Atualmente os testes para a liberação do uso de agrotóxicos consideram apenas sua toxicidade aguda para as abelhas, sem considerar os prejuízos que podem ser decorrentes da exposição desses polinizadores a doses subletais.

A pulverização aérea de agrotóxicos pode carregar os princípios ativos a grandes distancias, devido à ação do vento, atingindo organismos não alvos, fenômeno conhecido como “efeito deriva” (PEREIRA, 2010). Dessa forma, mesmo que aplicados em cultivos não visitados por abelhas, os agrotóxicos podem contaminar recursos localizados a grandes distancias do local de aplicação, ou permanecer em áreas tratadas por longos períodos, devido ao seu efeito residual.

Mullin et al. (2010) relataram haver associação direta entre a exposição das abelhas aos agrotóxicos, a ocorrência da CCD e o declínio dos polinizadores nativos. Segundo Souza (2009), uma das hipóteses para o agravamento da CCD é a intoxicação das abelhas por inseticidas, cada vez mais utilizados na agricultura.

2.1. Impacto da utilização de inseticidas para abelhas melíferas

O efeito dos inseticidas sobre a fauna dos polinizadores tem sido bem evidenciado, sendo diretamente responsável pela redução das populações de abelhas, da produção apícola e indiretamente pelas perdas na produção de diversas culturas agrícolas (FREITAS; PINHEIRO, 2012). Os principais grupos de inseticidas são representados pelos hidrocarbonetos clorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA ONLINE, 2014).

A exposição das abelhas a inseticidas prejudica o forrageamento (COLIN et al., 2004), reduz a longevidade das operárias e da rainha, bem como seu peso (PETTIS et al., 2004); afeta a vitalidade da colônia (BELIEN et al., 2009), dentre outras mudanças comportamentais e fisiológicas que prejudicam a sobrevivência das colônias. Efeitos subletais de diversos agrotóxicos sobre as abelhas podem levar a mudanças fisiológicas e no comportamento individual (YANG et al., 2008; ALIOUANE et al., 2009) e a

alterações na fisiologia celular, devido ao estresse induzido por esses agentes (GREGORC e ELLIS, 2011).

O desenvolvimento de novos inseticidas, os neonicotinoides e fenilpirazóis, a partir de 1990, representou avanço no combate a pragas resistentes aos inseticidas comumente utilizados, porém trouxe grande preocupação devido aos efeitos negativos desses compostos para as abelhas.

Na França, perdas de até 40% das colmeias foram registradas após a liberação do uso de fenilpirazóis em cultivos agrícolas (SOUZA, 2009). A redução de colônias de abelhas *A. mellifera* e a contaminação do ambiente na França, Itália, Alemanha e Eslovênia, após a liberação do uso de inseticidas fenilpirazóis, levaram esses países a proibirem sua utilização a partir de 1999 (GHISI et al., 2011). Apesar disso, no Brasil a utilização desses inseticidas vem aumentando anualmente, trazendo prejuízos ao ambiente e ameaçando os polinizadores.

Aproximadamente 90% dos inseticidas possuem ação neurotóxica prejudicando a transmissão dos impulsos nervosos nos organismos intoxicados (PEREIRA, 2010). A condução do impulso nervoso ao longo das células nervosas é dependente da concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- ; entretanto, para que ocorra a propagação dos estímulos nervosos entre as sinapses é necessária a ação de neurotransmissores. A acetilcolina e o ácido gama amino butírico (GABA) são os principais neurotransmissores dos insetos (DOWSON, 1977).

A acetilcolina atua nas extremidades nervosas pré-sinápticas, ligando-se a célula pós-sináptica e ao receptor do canal iônico, permitindo a passagem trans membrana de íons Na^+ e K^+ . A despolarização resultante da membrana pós-sináptica desencadeia a contração muscular ou inicia o potencial de ação no neurônio pós-sináptico (LEHNINGER et al., 1996). Grande parte dos inseticidas possui ação específica sobre esse neurotransmissor.

O neurotransmissor GABA atua nas junções glutanérgicas, presentes no sistema nervoso central e nas junções neuromusculares (MOHLER et al., 2004). Normalmente, o GABA atua como inibidor do estímulo nervoso na membrana pós-sináptica, reestabelecendo o estado de repouso do sistema nervoso central e muscular, aumentando a permeabilidade da membrana aos íons Cl^- . Os inseticidas fenilpirazóis são antagonistas do neurotransmissor GABA, impedindo a entrada dos íons Cl^- no neurônio,

resultando em atividade neural excessiva, tremores, paralisia e morte dos insetos (AAJOUD et al., 2003; MANRIQUE, 2009).

O principal ingrediente ativo do grupo dos fenilpirazóis é o inseticida fipronil, que possui alta persistência no ambiente. Esse inseticida foi sintetizado pela Rhône Poulenc Ag Company, atual Bayer Crop Science em 1987, lançado em 1993 e registrado nos EUA em 1996 (WARE, 2000).

O fipronil quando pulverizado e exposto a condições ambientais pode ser convertido nos metabólitos sulfona, dussulfinil, sulfeto e fenil amida, que também apresentam alta toxicidade para invertebrados (KONWICK et al., 2006). O tempo de vida médio desses compostos varia de acordo com as condições ambientais, tipo de substrato e dose aplicada, podendo chegar a 693 dias (CONNOLLY, 2001).

Valores de DL_{50} de ingestão do inseticida fipronil em abelhas melíferas variam de 0,00327 a 0,23 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ (MAYER; LUNDEN, 1999; SOUZA, 2009; BOVI, 2013); e as DL_{50} de contato encontradas estão entre 0,000157 a 0,013 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ (MAYER; LUNDEN, 1999; TINGLE et al., 2003; SOUZA, 2009; BOVI, 2013). As diferenças nos valores de DL_{50} obtidas para um mesmo agrotóxico são atribuídas a diversos fatores que influenciam nos testes, como a variabilidade genética de cada população de abelhas testada, variações climáticas locais e manipulação do pesquisador (PEREIRA, 2010).

No Brasil, o inseticida fipronil apresenta autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA para comercialização em diversas formulações, incluindo: isca granulada – Blitz® (0,03g/kg) usada como formicida com aplicação terrestre; suspensão concentrada – Standak® (250 g/L) usado no tratamento de sementes; granulado – Regent® 20 G (20g/kg) com aplicação no solo; granulado dispersível - Regent® 800 WG (800 g/kg) com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada - Klap® (200g/L) com aplicação terrestre e aérea. O fipronil é utilizado para o controle de pragas nas culturas de algodão, arroz, batata, cana de açúcar, milho, soja, cevada, feijão, trigo, pastagens e eucalipto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

Chauzat et al. (2006) encontraram fipronil em amostras de pólen na França, em quantidade de $1,2\mu\text{g kg}^{-1}$. No Uruguai, o fipronil foi detectado em amostras de mel e em abelhas nas quantidades entre 40 e $100\mu\text{g kg}^{-1}$ e 150 e $170\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (PAREJA et al., 2011). Em países da União Europeia a taxa de aplicação do fipronil

varia entre 17,5 e 44g/i.a/ha. Cultivos tratados com essa quantidade de ingrediente ativo apresentaram respectivamente 2,3 e 6,4µg fipronil kg⁻¹ de pólen (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013). No entanto, o uso do fipronil em países da América Latina, em algumas culturas é autorizado em doses entre 80 e 400g/i.a/ha (BASF, 2014).

Considerando as altas doses do fipronil utilizadas em cultivos agrícolas e sua alta persistência no ambiente, esse inseticida representa grande risco aos polinizadores. A exposição direta dos polinizadores a altas doses do fipronil (superiores ou iguais a DL₅₀) durante a pulverização pode resultar em sua morte imediata, devido à alta toxicidade desse ingrediente ativo. Além dos efeitos agudos, a comprovada ação sistêmica do fipronil faz com que cultivos tratados durante o plantio ou fora do período de floração, apresentem resíduos desse inseticida ou de seus metabólitos no pólen e néctar (TRAPP; PUSSEMIER, 1991). Como consequência, as abelhas podem experimentar a exposição crônica a esse inseticida, coletando recursos contaminados com doses subletais e os armazenando nas colmeias, o que prejudica o desenvolvimento e sobrevivência das colônias em longo prazo (JOHNSON et al., 2010).

Em doses subletais, o fipronil pode afetar a percepção gustativa, o aprendizado olfatório das abelhas, que são funções essenciais no forrageamento desses insetos (EL HASSANI et al., 2005). Deve-se também considerar, que na maioria dos cultivos agrícolas ocorrem aplicações frequentes de uma ou mais classes de inseticidas, herbicidas, fungicidas e outros produtos, visando combater diferentes pragas. Dessa forma, os recursos coletados pelas abelhas podem ser contaminados por diversos agrotóxicos, sendo que a combinação dessas substâncias pode trazer consequências ainda mais negativas às abelhas (GILL et al., 2012).

El Hassani et al. (2005) estudaram a influência de doses subletais do fipronil na aprendizagem olfativa de abelhas *A. mellifera* e verificaram redução significativa à dose de 0,0005µg/abelha, aplicada topicamente. Aliouane et al. (2009) verificaram que abelhas recém-nascidas expostas a doses subletais do fipronil (0,0001 e 0,00001µg/abelha), por contato e ingestão, apresentaram comprometimento na aprendizagem olfatória; aquelas tratadas com 0,0001µg/abelha morreram sete dias após a exposição e com 0,00001µg/abelha ingeriram mais água que os outros tratamentos, apresentando maior imobilidade e comprometimento dos seus movimentos. Cruz et al.

(2010) verificaram morte das células do intestino médio em abelhas alimentadas com 0,1 e 1 µg/g de fipronil.

A atividade motora é importante para a atividade de forrageamento e orientação das abelhas durante a “dança” utilizada para indicar a localização de fontes de recursos para a colônia, podendo ser afetada por inseticidas (EL HASSANI et al., 2005). Souza (2009) observou deficiência na atividade motora em abelhas tratadas por contato com a dose de 0,001 µg do fipronil por abelha. Decourtye et al. (2011) utilizando a técnica de monitoramento de abelhas por radiofrequência, com microchips, verificaram que as abelhas ao ingerirem dieta contaminada com 0,0003 µg fipronil/abelha apresentaram redução do número de viagens de forrageamento, que pode estar relacionado a alterações motoras desencadeadas por esse inseticida.

Os agrotóxicos podem ainda, interagir com agentes patogênicos presentes na colmeia ou ambiente prejudicando a saúde das abelhas, estando relacionados à CCD (VAN ENGELSDORP et al., 2009; JOHNSON et al., 2010). Vidau et al. (2011) e Aufavre et al. (2012) realizaram pesquisas com abelhas infectadas simultaneamente com doses subletais do fipronil e com o parasita *Nosema ceranae*, constatando que o efeito sinérgico desses estressores (químico e biológico), reduz a sobrevivência das abelhas, principalmente de recém-nascidas. Bernal et al. (2011) verificaram que as colmeias de abelhas que coletaram pólen de girassol (*Helianthus annuus*), cultivado com sementes tratadas com fipronil, ficaram mais susceptíveis ao ataque do ácaro *Varroa destructor*. Pettis et al. (2013) detectaram 35 diferentes agrotóxicos em pólen coletado por *A. mellifera*, sendo verificada maior susceptibilidade das colônias a infecções por *N. ceranae* quando o pólen apresentava resíduos de inseticidas e fungicidas.

Pesquisas realizadas por Mullin et al. (2010) constataram que colônias de abelhas expostas a agrotóxicos, apresentam prejuízos na sua organização social, tornando as colônias mais suscetíveis a doenças e abandono. Gregorc et al. (2012) demonstraram que abelhas aumentam a expressão de genes do sistema imunológico, relacionados ao reconhecimento de patógenos, na presença do ácaro *V. destructor*. No entanto, esses autores verificaram que na presença do ácaro, quando as abelhas foram expostas a agrotóxicos, não houve alteração na expressão gênica, implicando na redução da resistência das abelhas contra parasitas e doenças.

A exposição de colônias de mamangavas (*Bombus sp.*) a inseticidas neonicotinoides e piretroides em doses subletais prejudicou o forrageamento e aumentou a mortalidade de operárias, levando a redução do desenvolvimento da ninhada e manutenção da colônia (GILL et al., 2012). Estudos realizados por Whitehorn et al. (2012) demonstraram que o crescimento de colônias de *Bombus sp.* e a produção de rainhas foram reduzidos quando essas foram expostas a alimentação contaminada com a dose subletal de 0,7 a 6µg/L de inseticidas neonicotinoides. Essa redução não foi evidente durante as primeiras duas semanas, demonstrando que as colônias intoxicadas inicialmente reduziram o consumo de alimento, sendo posteriormente observado redução de postura e falhas no desenvolvimento das crias.

Estudos vêm demonstrando que as abelhas entram em maior contato com agrotóxicos acumulados nas colmeias durante o inverno, ficando mais susceptíveis ao ataque de parasitas como o ácaro *V. destructor* e outros patógenos, que podem se desenvolver neste período (DECOURTYE et al., 2003; VAN ENGELSDORP et al., 2009). O maior tempo de exposição das abelhas a pesticidas em doses subletais durante inverno é evidenciado pelo acúmulo dessas substâncias e seus metabólitos no corpo gorduroso das abelhas. No inverno, as abelhas são quatro vezes mais suscetíveis ao efeito de pesticidas em doses subletais (DECOURTYE et al., 2003).

A toxicidade de doses subletais do fipronil pode estar relacionada ao desaparecimento das abelhas, principalmente em períodos de inverno, quando se observa o maior número de perdas de colmeias (KAPLAN, 2014).

2.2. Efeitos de agrotóxicos na expressão de genes do sistema imunológico em abelhas e uso da PCR no seu estudo

O sequenciamento do genoma das abelhas *A. mellifera* revelou possíveis explicações para a alta sensibilidade das abelhas a agrotóxicos. Comparado ao genoma de *Drosophila sp.* e *Anopheles sp.*, as abelhas têm menos da metade do número de genes que codificam enzimas de desintoxicação, incluindo as enzimas monooxigenases do citocromo P450 (P450), glutathiona-s-transferase e carboxilesterases (CLAUDIANOS et al., 2006). Menor número de genes envolvidos na imunidade também foi encontrado

em abelhas, cerca de um terço comparado ao genoma de *Drosophila sp.* e *Anopheles sp.* (EVANS et al., 2006).

Dentre os genes mais importantes do sistema imunológico das abelhas, estão os que codificam a expressão da defensina 1, abaecina, himenoptaecina, apidaecina, toll, hopscotch e profenoloxidase (GREGORC et al., 2012; SIEDE et al., 2012).

A defensina é um peptídeo antibacteriano que possui duas formas (defensina I e defensina II) expressas por diferentes genes. Apresenta papel fundamental no combate a doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e outros patógenos nos insetos, principalmente para as abelhas *A. mellifera*. A defensina I é sintetizada na cabeça e tórax das abelhas, principalmente pelas glândulas mandibulares e hipofaringeanas e liberada na geleia real e mel, estando relacionada à imunidade social da colmeia. A defensina II é sintetizada por células do corpo gorduroso e na hemolinfa das abelhas, sendo responsável pela imunidade individual. Pesquisas vêm demonstrando que o aumento da síntese de defensinas nas abelhas pode aumentar a defesa das colônias contra doenças (ILYASOV et al., 2012).

Após o sequenciamento do genoma das abelhas *A. mellifera* diversos estudos vêm sendo realizados na área da genética molecular, abordando principalmente alterações na expressão gênica, por meio da técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real) (EVANS, 2006; MUSTARD et al., 2010; FANG et al., 2012). A RT-PCR é a técnica na qual são produzidas cópias de cDNA (DNA complementar) a partir da fita simples de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro). A fita de DNA complementar é formada basicamente pela ação de uma enzima (TR) Transcriptase Reversa e primers randômicos, que maximiza o número de moléculas de RNAm que podem ser analisadas a partir de pequena amostra de RNA. O cDNA é utilizado como amostra biológica para amplificação de um determinado fragmento (BUSTIN et al., 2005).

A RT-PCR é a metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação (GINZINGER, 2002). Durante a reação, o acúmulo de amplicons é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas de sequências específicas ou primers usados na reação (FARDEL et al., 2004). O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de RNAm mais simples e precisa

(BARBANY et al., 2000). A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Boncristiani et al. (2012) desenvolveram estudo com o intuito de identificar o impacto que o ácaro *V. destructor* e acaricidas utilizados em seu controle causam sobre as abelhas *A. mellifera*. Para o estudo foram selecionados 50 genes e as colmeias foram tratadas com cinco diferentes acaricidas (Apiguard, Apistan, Checkmite, Miteaway e ApiVar). Os pesquisadores observaram alteração da expressão de diversos genes relacionados à resposta imune, desenvolvimento e desintoxicação das abelhas.

Estudos realizados por Derecka et al. (2013) demonstraram que doses equivalentes a 2µg/L de alguns inseticidas podem alterar a atividade de genes em *A. mellifera*. Larvas expostas a inseticidas aumentaram a expressão de genes que produzem enzimas detoxificadoras, com maior gasto celular para essa atividade resultando na redução da expectativa de vida ou mortalidade larval. Di Prisco et al. (2013) identificaram o imunomodulador NF-κB, que reduz a resposta imune das abelhas no combate de doenças. Ao testar a exposição das abelhas a inseticidas, observaram que a transcrição do gene que codifica esse inibidor aumenta permitindo a replicação de vírus nocivos às abelhas.

A exposição das abelhas a doses letais e subletais do inseticida fipronil pode trazer graves prejuízos para as abelhas e colônias, sendo fundamental o estudo aprofundado de seus efeitos. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram:

- Determinar a toxicidade (DL₅₀) do inseticida fipronil e as alterações comportamentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas em testes de ingestão e contato, em laboratório;
- Estudar as possíveis alterações na atividade motora de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas à DL₅₀ e dose subletal (DL_{50/500}) do inseticida fipronil em testes de ingestão e contato, em laboratório;
- Estudar possíveis alterações no comportamento de abelhas adultas, viabilidade de cria e desenvolvimento populacional de enxames de *Apis mellifera* africanizadas alimentados com a dose subletal (DL_{50/500}) do inseticida fipronil em condição de campo;

- Estudar possíveis alterações na expressão do gene que codifica a defensina 1 em abelhas *Apis mellifera* africanizadas adultas expostas à dose subletal ($DL_{50/500}$) do inseticida fipronil em campo.

A presente pesquisa resultou no artigo intitulado **“Fipronil promove alterações comportamentais e motoras em abelhas *Apis mellifera* africanizadas e afeta o desenvolvimento de colônias expostas à dose subletal”**, o qual será submetido à revista *Apidologie*, conforme as suas normas de publicação.

Referências

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **J. Agric. Food**, v. 26, n. 51, p. 1347-1352, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico F43: Fipronil.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eba05f80474594f39c9fdc3fbc4c6735/f43.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 out. 2014.

ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.

AUFAVRE, J. et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Sci. Rep.**, v. 2, n. 326, p. 1-7, 2012.

BARBANY, G. et al. Manifold-assisted reverse transcription-PCR with real-time detection for measurement of the BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 7, p. 913-920, 2000.

BASF. **Inseticides:** Regent® 800 WG. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/insecticides/insecticides_product/Regente_800_WG> Acesso em: 13 Mar. 2014.

BASSIL, K. L. et al. Cancer health effects of pesticides: Systematic review. **Can. Fam. Physician**, v. 53, n. 10, p. 1704-1711, 2007.

BELIEN, T. et al. Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. **Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.**, v. 74, n. 1, p. 245-253, 2009.

BERNAL, J. et al. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. **Pest Manage. Sci.**, v. 67, n. 10, p. 1320-1331, 2011.

BONCRISTIANI, H. et al. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels of honey bee *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v. 58, n. 5, p. 613-620, 2012.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 34, p. 597-601, 2005.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 98p.

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

CLAUDIANOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

COLIN, M. E. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 47, n. 3, p. 387-395, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento/agosto 2013.** Brasília: Conab, 2013.

CONNOLLY, C.N. The risk of insecticides to pollinating insects. **Commun. Integr. Biol.**, v.6, n.5, p. e25074, 2013.

CONNOLLY, P. **Environmental fate of fipronil, California Environmental Protection Agency**: Department of Pesticide Regulation - 2001. Disponível em: <<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>>. Acesso em: 5 Feb. 2014.

CONTE, Y. L.; ELLIS, M.; RITTER, W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 353-363, 2010.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999. 682p.

CRUZ, A. D. et al. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 26, n. 2, p. 165-176, 2010.

DANFORTH, B. N. et al. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 41 p. 15118-15123, 2006.

DECOURTYE, A. et al. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 429-437, 2011.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELEGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera*) are differentially affected by imidaclopride according to the season. **Pest Manag. Sci.**, v. 59, n. 3, p. 269-278, 2003.

DERECKA, K. et al. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68191, 2013.

DI PRISCO, G. et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 110, n. 46, p. 18466-18471, 2013.

DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pestic. Sci.**, v. 8, n. 6, p. 651-660, 1977.

EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 82, n. 1, p. 30-39, 2005.

EMATER-RS: **Congresso Brasileiro de Agroecologia debate transgênicos e agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticia/197905/congresso-brasileiro-de-agroecologia-debate-transgenicos-e-agrotoxicos>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA ONLINE. **Insecticide**. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/289077/insecticide>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

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

EVANS, J. D. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 93, n. 2, p. 135-139, 2006.

EVANS, J. D. et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 645-656, 2006.

FANG, Y. et al. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). **J. Proteomics**, v. 75, n. 3, p. 756-773, 2012.

FARDEL, S.; HONCHHAUS, A.; HUGHES, M. D. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 18, n. 3, p. 657-670, 2004.

FLETCHER, M.; BARNETT, L. Bee poisoning incidents in the United Kingdom. **Bull. Insectol.**, v. 56, n. 1, p. 141-145, 2003.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecol. Aust.**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Polinizadores e pesticidas**: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. Brasília: MMA, 2012. 112p.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecol. Econ.**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

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

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hematol.**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GREGORC, A. et al. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). **J. Insect Physiol.**, v. 58, n. 8, p. 1042-1049, 2012.

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 99, n. 2, p. 200-207, 2011.

HICKMAN JUNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 15. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2010. 842 p.

ILYASOV, R. A. et al. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. **J. Apic Sci.**, v. 56, n. 1, p. 115-124, 2012.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection: a bee & pesticide handbook**. Cheshire: Wicwas Press, 1990. 212 p.

JOHNSON, R. M. et al. Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

KAPLAN, K. **Fact sheet: survey of bee losses during winter of 2012/2013**. Disponível em: < <http://www.ars.usda.gov/is/br/beelosses/index.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2014.

KONWICK, B. J. et al. Bioaccumulation, biotransformation and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. **Environ. Sci. Technol.**, v. 1, n. 40, p. 2930-2936, 2006.

KREMEN, K. et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecol. Lett.**, v. 10, n. 4, p. 299-314, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier Ltda, 1996. 839 p.

MANRIQUE, W. G. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. 2009. 58 f.

Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

MIRANDA, J. E. et al. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.

MOHLER, H. et al. Specific GABA (A) circuits in brain development and therapy. **Biochem. Pharm.**, v. 15, n. 8, p. 1685-1690, 2004.

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

MUSTARD, J. A.; PHAM, P. M.; SMITH, B. H. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. **J. Insect Physiol.**, v. 56, n. 4, p. 422-430, 2010.

NABHAN, G.P.; BUCHMANN, S.L. Services provided by pollinators. In: DAILY, (Ed.) **Nature's services: societal dependence on natural ecosystems**. Washington D.C.: Island Press, 1997. 133-150p.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotechnol. Ciênc. Desenvol.**, v. 33, p. 10-13, 2004.

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

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

PAREJA, L. et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, n.10, p. 3844-3858, 2011.

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

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PEREIRA, A. M.; CHAUD-NETTO, J. Africanized honeybees: biological characteristics, urban nesting behavior and accidents caused in Brazilian cities (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 3, p. 535-550, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. (Org.). **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. 384 p.

PETTIS, J. et al. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 35, n. 6, p. 605-610, 2004.

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

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

RATNIEKS, F. L. W.; CARRECK, N. L. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecol. Lett.**, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.

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

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

TINGLE, C. C., et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 176, p. 1-66, 2003.

TRAPP, S.; PUSSEMIER, L. Model calculations and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. **Chemosphere**, v. 22, n. 3, p. 327-339, 1991.

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

VIDAU, C. et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 6 n. 6, p. e21550, 2011.

WARE, G. W. **The Pesticide Book**. 5. ed. Fresno: Thomson Publications, 2000. 69 p.

WHITEHORN, P.R. et al. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 351-352, 2012.

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

YANG, E. C. et al. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 101, n. 6, p. 1743-1748, 2008.

CAPÍTULO II

Fipronil promove alterações comportamentais e motoras em abelhas *Apis mellifera* africanizadas e afeta o desenvolvimento de colônias expostas à dose subletal

Toxicidade do inseticida fipronil para abelhas

Resumo

No presente estudo avaliou-se a toxicidade (DL_{50}) *in vitro* do fipronil e as alterações comportamentais em abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), em testes de contato e ingestão, bem como a atividade motora em abelhas expostas à DL_{50} e dose subletal (DS – $1/500 DL_{50}$). A DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$) foi fornecida por meio de xarope de açúcar, para colmeias e avaliou-se a viabilidade de cria, desenvolvimento populacional, comportamento e expressão do gene defensina 1 em abelhas adultas. O fipronil foi altamente tóxico por ingestão e contato, desencadeando agitação, convulsão, tremores e paralisia. Houve redução da atividade motora de abelhas expostas às DL_{50} e DS. Verificou-se redução da eclosão de ovos, postura, desenvolvimento de larvas e pupas e abandono dos enxames expostos à DS. Abelhas adultas apresentaram inércia nos enxames expostos à DS, sem apresentar alteração na expressão do gene defensina 1. Conclui-se que o fipronil apresenta efeitos altamente tóxicos para as abelhas *A. mellifera*.

abelhas / fenilpirazois / polinizadores / colapso / expressão gênica /

Fipronil promote locomotor and behavioral changes in Africanized *Apis mellifera* and affects the development of colonies exposed to sublethal dose

Toxicity of insecticide fipronil to honeybees

Abstract

In the present study we evaluated the *in vitro* toxicity (LD₅₀) of fipronil and behavioral changes in adults *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in contact and ingestion tests and the motor activity in bees exposed to the LD₅₀ and sublethal dose (SD - 1/500 LD₅₀). The SD (8µg L⁻¹) was provided through the sugar syrup to hives and were evaluated the brood viability, population growth, behavior and expression of defensin 1 gene in adult bees. Fipronil was highly toxic by ingestion and contact, triggering agitation, seizures, tremors and paralysis. There was a reduction of motor activity of bees exposed to LD₅₀ and SD. We observed reduced of hatching eggs, posture, larvae and pupae development and abandonment of colonies exposed to SD. Adult bees exposed to SD in swarms demonstrate inertia, without alterations in the defensin 1 gene expression. We concluded that fipronil have highly toxic effects to honeybees.

bees / phenylpyrazoles / pollinators / collapse / gene expression /

1. Introdução

As abelhas *A. mellifera* tem grande importância na produção apícola, polinização de cultivos agrícolas e vegetação nativa. Estima-se que o valor do serviço realizado por esses insetos é superior a 216 bilhões de dólares anuais, considerando apenas a produção de culturas utilizadas diretamente na alimentação humana (Gallai et al. 2009). Apesar da sua importância, consideráveis perdas de enxames manejados na apicultura e redução da diversidade de abelhas nativas vêm sendo observadas em todo mundo (Oldroyd 2007; Stokstad 2007; Potts et al. 2010; Van Engelsdorp e Meixner 2010; Lu et al. 2012; Kaplan 2014), o que representa ameaça a segurança alimentar e manutenção dos ecossistemas.

Em 2006, síndrome denominada Colony Collapse Disorder (CCD) foi descrita nos Estados Unidos, caracterizada pelo agravamento da perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou proximidades da colmeia e abandono das crias e alimento no ninho (Van Engelsdorp et al. 2009). Entre os anos de 2012 e 2013, a perda de 31,1% das 2,5 milhões de colmeias nos EUA foi atribuída a CCD (Kaplan 2014), o que representa mais de 777.000 enxames (Stokstad 2007), totalizando prejuízo que ultrapassa 116 milhões de dólares, sem considerar as perdas na produção apícola e de culturas agrícolas dependentes da polinização. Na Europa foram descritas perdas de até 53% do total de colmeias manejadas em alguns países (Williams et al. 2010). A perda de colônias ocasiona prejuízos aos apicultores que necessitam repovoar suas colmeias, onerando os custos da atividade e reduzindo a produção apícola.

A redução de colônias de *A. mellifera* pode interferir na qualidade, quantidade e preço de frutas e sementes utilizadas na alimentação humana e animal, além de contribuir para a perda da biodiversidade. Uma das consequências imediatas da CCD foi a elevação dos custos do aluguel de colônias para polinização de cultivos agrícolas, que nos EUA passou de 50 para 200 dólares a partir de 2007 (Stokstad 2007).

Os principais fatores investigados como causadores da CCD envolvem a destruição de habitats e escassez de recursos florais (Oldroyd 2007; Freitas et al. 2009), presença de patógenos e parasitas (Oldroyd 2007; Bromenshenk et al. 2010), mudanças climáticas (Van Engelsdorp e Meixner 2010) e elevado uso de adjuvantes e agrotóxicos (Van Engelsdorp et al. 2009; Johnson et al. 2010; Decourtye et al. 2011; Ciarlo et al.

2012; Connolly 2013). O uso de inseticidas sistêmicos em cultivos agrícolas, incluindo fenilpirazóis e neonicotinoides (Connolly 2013), podem contaminar os recursos coletados pelas abelhas e ter relação à ocorrência da CCD, devido a sua toxicidade.

O inseticida fipronil pertencente à classe dos fenilpirazóis, utilizado para o controle de pragas em cultivos agrícolas (Tingle et al. 2003). O fipronil pode gerar alterações comportamentais que prejudicam a atividade de forrageamento e comunicação das abelhas (Colin et al. 2004; Aliouane et al. 2009), além de tornar as colônias mais vulneráveis ao ataque de patógenos e parasitas (Vidau et al. 2011; Aufauvre et al. 2012).

A contaminação de recursos coletados pelas abelhas campeiras por doses subletais de inseticidas, não ocasionam sua mortalidade imediata e possibilitam a coleta e estocagem dessas substâncias nas colônias. A maior perda de enxames no inverno (Oldroyd 2007; Williams et al. 2010; Kaplan 2014), pode estar relacionada ao efeito de doses subletais de inseticidas, devido ao consumo do alimento estocado e aumento da longevidade das abelhas no inverno (Page e Peng 2001). Considerando a detecção do fipronil em recursos coletados pelas abelhas e em colônias (Mullin et al. 2010; Pareja et al. 2011; European Food Safety Authority 2013; Lambert et al. 2013) é importante investigar a exposição das abelhas a doses subletais desse inseticida em longo prazo.

Alguns agrotóxicos podem afetar a expressão de genes importantes na resistência das abelhas às doenças e parasitas (Boncristiani et al. 2012). O estudo da expressão de genes relacionados à resposta imune de abelhas expostas a doses subletais de inseticidas, pode contribuir para verificar a existência de alterações que interferem na sanidade das colônias.

Considerando os prejuízos da redução de colônias de abelhas *A. mellifera* para a economia mundial, que podem estar relacionados à exposição ao fipronil, torna-se fundamental investigar a toxicidade desse inseticida em testes de laboratório e campo, buscando evidenciar possíveis alterações que podem contribuir para o colapso das colônias.

No presente estudo, determinou-se em laboratório a toxicidade (DL_{50}) do fipronil e as alterações comportamentais de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas a doses desse inseticida por ingestão ou contato. Avaliou-se também a atividade motora de abelhas expostas à DL_{50} ou à dose subletal (DS - $1/500 DL_{50}$) de

ingestão e contato. Em campo, avaliou-se a viabilidade de cria, desenvolvimento populacional, comportamento das abelhas adultas e expressão do gene defensina 1 (que codifica a expressão de um peptídeo antibacteriano) em enxames alimentados com xarope de açúcar contaminado com a DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$) do fipronil.

2. Metodologia

2.1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido na Área de Produção de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Câmpus de Botucatu, coordenadas geográficas: $22^{\circ}50'30''\text{S}$; $48^{\circ}25'41''\text{O}$, com clima tipo Cfa e altitude média de 623 metros.

2.2. Testes de toxicidade

Foram utilizadas abelhas *A. mellifera* africanizadas, com mais de 20 dias de idade, coletadas em única colmeia, a fim de reduzir variações genéticas que poderiam interferir nos testes. 480 abelhas campeiras que regressavam do campo foram coletadas no alvado da colmeia, utilizando caixa armadilha, entre as 07h00 e 08h00 da manhã e anestesiadas em freezer a -10°C por 1 a 2 minutos. Duas formas de exposição foram usadas para avaliar a toxicidade: ingestão de alimento contaminado e contato com o inseticida diluído.

O ingrediente ativo fipronil foi utilizado a partir da formulação comercial utilizada em campo: Regent 800WG[®] - 800 g i.a. fipronil/kg- (80% m/m); Ingredientes Inertes - 200 g/kg (20% m/m) (BASF Agri-Production SAS, Saint Aubin Les Elbeuf, Cleon, França). Foi preparada uma solução de 1g L^{-1} de Regent 800WG[®] diluída em água destilada, sendo as demais doses utilizadas preparadas a partir dessa solução. Para todas as diluições utilizadas nos testes, considerou-se apenas a quantidade de ingrediente ativo fipronil, sem considerar os ingredientes inertes. Não foram observados problemas com a solubilidade. As soluções foram agitadas vigorosamente durante a preparação e antes da sua utilização.

A DL_{50} de ingestão foi determinada de acordo com metodologia descrita por Miranda et al. (2003). As abelhas foram colocadas em caixas de madeira descartáveis (25,0 x 15,0 x 10,0 cm), com telas nas laterais e receberam 1 mL de alimento (xarope de açúcar - 50%) em tubo plástico (50 x 10 x 10 mm). O alimento foi contaminado de forma que cada abelha ao consumir 50 μ L, que corresponde ao volume médio da vesícula melífera (Thompson e Hunt 1999), ingeria 0,005; 0,010; 0,021; 0,043; 0,087; 0,175; 0,350; ou 0,000 μ g do fipronil (controle). Após coletadas, as abelhas permaneceram três horas em jejum antes de iniciar os testes, a fim de garantir o consumo do alimento contaminado, que foi fornecido durante três horas, posteriormente substituído por xarope de açúcar.

Para determinação da DL_{50} por contato, as abelhas coletadas foram imediatamente anestesiadas e transferidas para bandejas plásticas descartáveis (25 x 15 x 10 cm). Em seguida receberam 2 μ L da solução de fipronil no tórax, nas concentrações 0,0035; 0,0070; 0,0140; 0,0280; 0,0560; 0,1120; 0,2240; ou 0,0000 μ g (controle) aplicadas com micropipeta automática. As abelhas receberam xarope de açúcar *ad libitum* durante todos os testes.

As doses utilizadas nos testes de ingestão e contato para cálculo da DL_{50} foram determinadas com base em testes preliminares, observando a mortalidade de abelhas expostas a doses do fipronil durante 24 horas. Para cada dose testada na determinação da DL_{50} de ingestão e contato foram utilizadas 10 abelhas, sendo todos os testes realizados em triplicata. Abelhas com alterações comportamentais ou em estado de letargia foram rejeitadas e substituídas por abelhas saudáveis, antes de iniciar os testes. As alterações comportamentais nas abelhas (agitação, convulsão, tremores e paralisia) foram observadas 30, 60, 90 e 120 minutos após o início dos testes de toxicidade, sendo cada grupo de 10 abelhas observado por 2 minutos (nos testes de ingestão, considerou-se o tempo de três horas para consumo das doses). As abelhas foram mantidas no escuro à temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), com umidade entre 60 e 65%, sendo as observações realizadas na presença de luz. Decorridas 24h do início dos testes, o número de abelhas mortas em cada tratamento foi contabilizado e os resultados utilizados para determinar a DL_{50} . Em todos os testes, a mortalidade do grupo controle foi inferior a 5%.

2.3. Avaliação de alterações motoras

Verificou-se a ocorrência de alterações motoras em abelhas expostas por ingestão ou contato ao fipronil. Para isso, 720 abelhas adultas foram coletadas e expostas à dose letal (DL_{50}) ou subletal (DS) ($1/500 DL_{50}$) de ingestão e contato do fipronil. A coleta e exposição das abelhas foram realizadas utilizando os mesmos métodos descritos para os testes de toxicidade.

A atividade motora das abelhas foi avaliada nos tempos 1, 4 e 24 horas após sua exposição, considerando possível degradação do fipronil em metabólitos nesses intervalos de tempo (Hainzl et al. 1998; Narahashi et al. 2010). Os testes foram realizados em laboratório, utilizando uma caixa de observação de madeira (60 x 35 x 04 cm), dividida em cinco raia (50 x 05 x 04 cm), contendo uma lâmpada fluorescente na parte superior, coberta com vidro para permitir a observação das abelhas. Os testes foram realizados em local escuro, com a caixa inclinada em 45° e a lâmpada acesa, estimulando a locomoção das abelhas por fototaxia positiva (Lambin et al. 2001). As abelhas foram liberadas individualmente em cada raia, sendo anotado o tempo gasto para percorrer 50 cm. Para cada dose testada e para cada intervalo de tempo avaliado, foram utilizadas 10 abelhas tratadas e 10 abelhas controle. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.4. Teste de campo - efeito de DS do fipronil em colônias de *Apis mellifera* africanizadas

Nos testes de campo, foram utilizados 10 enxames de abelhas *A. mellifera* africanizadas, alojadas em colmeias padrão Langstroth, padronizadas quanto ao número de quadros de crias e alimento, com rainha jovem, sem a presença de sintomas de doenças ou parasitas. Os enxames receberam xarope de açúcar (50%) como alimento, sendo aleatoriamente distribuídos em dois grupos: Tratamento: alimentados com DS do fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$) e Controle: sem adição do inseticida. A DS do fipronil fornecida aos enxames corresponde a $1/500$ da DL_{50} de ingestão determinada no presente estudo, considerando o consumo de $50\mu\text{L}$ de alimento por abelha (Thompson e Hunt 1999).

O alimento foi fornecido aos enxames *ad libitum* em alimentadores individuais do tipo Boardman, durante 11 dias no período do inverno, a fim de garantir que as abelhas não teriam outras fontes de néctar disponíveis e que consumiriam o alimento

contendo a DS do fipronil. Diariamente o xarope de açúcar foi renovado e foi realizada mensuração da quantidade consumida por enxame. A temperatura mínima e média durante a realização do estudo em campo foi respectivamente de $12,6 \pm 3,45^{\circ}\text{C}$ e $17,8 \pm 4,09^{\circ}\text{C}$; precipitação pluviométrica $1,4 \pm 3,89$ mm e umidade relativa $70,3 \pm 15,32\%$.

Para avaliação da viabilidade de crias nos enxames, utilizou-se metodologia adaptada de Frommberger et al. (2012), delimitando uma área de 100 ovos, em todos os enxames, utilizando suportes de arame afixados diretamente nos favos. A área delimitada foi fotografada, sendo avaliada a eclosão dos ovos (72 h após a delimitação) e o número de pupas no 12º dia (período de entrada na fase de pré-pupa) e 19º dia (período que antecede o nascimento das operárias). O desenvolvimento populacional dos enxames foi avaliado, com mensuração das áreas (cm^2) de postura, cria aberta e fechada, em dois quadros do centro do ninho, de acordo com metodologia descrita por Al-Tikrity et al. (1971).

As revisões das colônias foram realizadas quinzenalmente junto à avaliação da viabilidade de crias e desenvolvimento populacional dos enxames, pelo período de 60 dias, desde o início do fornecimento do alimento. O comportamento das abelhas adultas foi observado diretamente nas colônias durante as revisões, observando a regularidade da movimentação, voo e comportamento de defesa, além da presença de abelhas mortas no interior e entorno das colmeias. Todas as colmeias foram inspecionadas a fim de verificar visualmente a presença de doenças que afetam as crias ou abelhas adultas (Nosemose, Cria Ensacada, Cria-Giz, Loque Americana e Europeia) e parasitas (*Varroa destructor*) de acordo com métodos descritos por Pennsylvania State University (2011). Após o término do experimento, os enxames do grupo controle foram revisados quinzenalmente, por um período de 20 semanas.

2.5. Expressão do gene defensina 1 em abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas em campo a DS de fipronil

Para análise da expressão do gene defensina 1, foram coletadas aleatoriamente e imediatamente congeladas a -80°C , cinco abelhas adultas por enxame exposto à DS do fipronil e controle, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 a partir do início do fornecimento da alimentação. O RNA foi extraído de um “pool” de cinco cabeças de abelhas (Scharlaken et al. 2008), utilizando 500 μl de TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA)

para cada amostra, de acordo com instruções do fabricante. O produto de extração foi visualizado em gel de agarose 1% e quantificado em aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C. Após, uma solução de oligo dT (N=18) 0,75 mM; oligos aleatórios (N=8) 0,15 mM; dNTPs 0,75 mM e 11 µl RNA tratado com DNase, foi preparada e incubada a 65°C por cinco minutos e colocada no gelo por um minuto. A esta preparação, foi adicionado tampão 1x DTT 0,005; RNase out 40 U e 100 U da enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta preparação foi incubada a 50°C por uma hora e depois a 70°C por 15 minutos.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos; um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A determinação da expressão do gene defensina 1 foi realizada por meio de Real Time PCR, em triplicatas, utilizando o gene actina como controle (Scharlaken et al. 2008). Para cada reação realizou-se um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água. As sequências e informações dos oligonucleotídeos utilizados são descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo da expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas à dose subletal (DS) do inseticida fipronil (8µg L⁻¹).

Gene	Nº de acesso no Gene Bank	Sequência dos Primers 5'- 3'	Amplificado (pb)	Ta ^a (°C)	E ^b (%)
Actina	AB023025	TGCCAACACTGTCCTTTCTG AGAATTGACCCACCAATCCA	155	61	91,17
Defensina 1	U159551	GTCGGCCTTCTCTTCATGGT GACCTCCAGCTTTACCCAAA	200	61	87,06

Ta^a - Temperatura ótima de anelamento específica de cada primer. E^b - Mensuração da eficiência da reação de Real Time PCR (calculada por meio da curva padrão).

A eficiência dos oligonucleotídeos (E) foi calculada a partir de quatro diluições das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, utilizando a fórmula $E=10(-$

1/inclinação). A quantificação relativa dos genes (R) foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), na qual o CP (crossing point) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo, utilizando a seguinte fórmula:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}} \Delta CP_{\text{alvo}}}{\Delta CP_{\text{endógeno}} (controle - amostra) E_{\text{endógeno}}}$$

2.6. Análises estatísticas

A DL_{50} de ingestão e contato com base na mortalidade por dose foi calculada utilizando a Análise Probit com probabilidade máxima, usando o programa estatístico Minitab (Minitab Inc 2001). Os resultados da avaliação da atividade motora, consumo de alimento, viabilidade de cria, desenvolvimento populacional e expressão gênica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey, sendo considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$ (Zar 2010).

3. Resultados

A DL_{50} (24h) de ingestão foi de $0,19 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{abelha}$, obteve-se a equação $Y = 0,6492 + 33,73 X - 50,05 X^{**2}$ (Figura 1A). A DL_{50} (24h) de contato foi de $0,009 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{abelha}$, obteve-se a equação $Y = 2,762 + 166,9 X - 1580 X^{**2} + 4314 X^{**3}$ (Figura 1B). O fipronil demonstrou maior toxicidade quando administrado por contato. As alterações comportamentais observadas incluíram agitação, convulsão, tremores e paralisia nas abelhas tratadas com doses entre $0,01$ e $0,35 \mu\text{g}$ nos testes de ingestão; e entre $0,007$ e $0,224 \mu\text{g}$ nos testes de contato, 30, 60, 90 e 120 minutos após sua exposição.

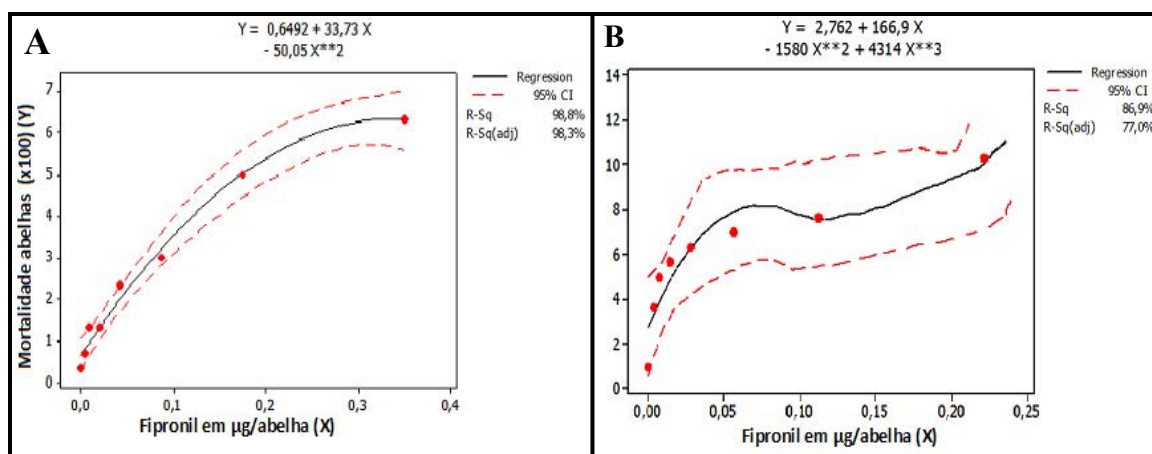


Figura 1. Ensaio de toxicidade aguda de *Apis mellifera* africanizadas expostas a doses do fipronil para cálculo da DL_{50} . A. Exposição por ingestão; B. Exposição por Contato.

As abelhas intoxicadas por ingestão ou contato com a DL_{50} levaram maior tempo para percorrer o trajeto avaliado (50 cm) nos testes de atividade motora, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 2). A redução da atividade motora observada em abelhas expostas no tempo 24 horas pode estar relacionada ao efeito prolongado do fipronil ou a formação de metabólitos tóxicos.

Tabela 2. Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas para percorrer 50 cm após exposição por ingestão ou contato com a DL_{50} do inseticida fipronil, nos tempos 1, 4 e 24 horas.

Tratamento	1 h	4 h	24 h
Controle	13,3±5,9a	17,5±5,1a	17,6±3,5a
DL_{50} Ingestão (0,2µg/abelha)	29,8±8,6b	27,2±6,9b	22,4±7,7b
Controle	13,7±3,8a	16,8±4,8a	17,7±5,5a
DL_{50} Contato (0,009µg/abelha)	32,8±8,1b	28,6±9,4b	26,2±9,0b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre médias ($P < 0,05$), usando o Teste de Tukey.

Na exposição das abelhas as DS do fipronil houve diferença no tempo para percorrer o trajeto avaliado (50 cm), 04 horas após sua exposição por ingestão e 24 horas após exposição por contato, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3). As alterações motoras observadas nas abelhas expostas a DS do fipronil por contato no tempo 24 horas podem ser devidos a maior toxicidade desse inseticida utilizando essa

via de exposição. O efeito prolongado do fipronil ou a formação de metabólitos tóxicos em diferentes tempos podem ter contribuído para a redução da atividade motora das abelhas.

Tabela 3. Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas para percorrer 50 cm após exposição por ingestão ou contato com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil, nos tempos 1, 4 e 24 horas.

Tratamento	1 h	4 h	24 h
Controle	13,2±6,8a	11,7±3,8a	17,8±3,6a
DS Ingestão (0,0004µg/abelha)	12,2±4,5a	16,6±3,9b	16,2±4,1a
Controle	13,8±4,1a	19,3±6,9a	17,9±4,2a
DS Contato (0,000018µg/abelha)	15,6±3,9a	17,3±5,1a	20,3±7,1b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre médias ($P < 0,05$) usando o Teste de Tukey.

O consumo de xarope de açúcar fornecido aos enxames não diferiu ($P > 0,05$) entre os enxames do grupo tratado e controle, sendo a média de consumo de $2064,3 \pm 200$ mL e $1950,2 \pm 50$ mL, respectivamente.

Nos enxames que receberam alimento com a DS do fipronil, houve redução da eclosão de ovos a partir da terceira quinzena; redução do número de pupas com 19 e 12 dias de idade a partir da primeira e segunda quinzena, respectivamente, em comparação aos enxames do grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e desvio padrão da viabilidade de cria (%) de enxames de *Apis mellifera* africanizadas que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).

Quinzena	Eclosão de ovos		Número de pupas 12º dia		Número de pupas 19º dia	
	Controle	DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$)	Controle	DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$)	Controle	DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$)
1ª	93,5±8,1a	93,9±5,40a	87,2±12,2a	69,2±12,7a	71,5±22,0a	29,2±17,7b
2ª	91,2±1,8a	62,6±13,6a	84,7±4,90a	22,7±14,9b	70,9±5,2a	5,3±3,50b
3ª	90,6±3,2a	55,4±32,8b	87,7±2,40a	16,1±22,2b	72,8±4,7a	6,22±0,7b
4ª	94,6±1,5a	10,1±15,2b	89,6±2,90a	0,0±0,0b	81,4±4,5a	0,0±0,0b

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre médias ($P < 0,05$) usando o Teste de Tukey.

Houve redução significativa na área de postura a partir da 6ª semana, da área de cria aberta a partir da 3ª semana e de cria fechada a partir da 4ª semana nos enxames alimentados com a DS do fipronil, em comparação aos enxames do grupo controle (Tabela 5). Durante as revisões, as abelhas que receberam dieta contaminada apresentaram inércia, caracterizada pela redução da movimentação, voo e menor comportamento de defesa das colônias; não foi observada mortalidade de abelhas no interior ou no entorno das colmeias. Houve redução gradual do número de abelhas adultas nas colônias. Nenhuma colmeia apresentou sintomas de doenças nas áreas de cria ou abelhas adultas e não houve infestação de *V. destructor* durante todo período experimental.

O desenvolvimento das larvas a partir da 8ª semana nos enxames expostos à DS do fipronil foi totalmente comprometido. Houve abandono de 100% das colmeias pelas abelhas adultas 60 dias após sua exposição à DS do fipronil. As colmeias abandonadas apresentaram estoques de mel e pólen. Todas as colônias do grupo controle mantiveram desenvolvimento inalterado e estavam vivas vinte semanas após o abandono das colmeias do grupo tratamento.

Tabela 5. Médias e desvio padrão das áreas de postura, cria aberta e cria fechada (cm²) de enxames de *Apis mellifera* africanizadas que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil (8µg L⁻¹).

Semana	Área de Postura		Área de Cria Aberta		Área de Cria Fechada	
	Controle	DS (8µg L ⁻¹)	Controle	DS (8µg L ⁻¹)	Controle	DS (8µg L ⁻¹)
1ª	48,2±24,4a	79,4±19,9a	40,2±31,9a	27,2±12,2a	104,2±66,0a	116±39,2a
2ª	46,0±14,5a	55,8±12,6a	43,8±23,0a	55,0±17,6a	73,8±55,2a	19,8±12,1a
3ª	60,2±36,2a	58,2±16,4a	41,4±13,4a	9,6±7,1b	87,2±60,6a	36,4±18,9a
4ª	84,4±70,1a	24,4±8,0a	55,0±37,6a	7,4±4,1b	72,8±18,8a	5,0±6,0b
5ª	90,6±77,5a	17,8±10,3b	76,0±62,2a	5,8±6,4b	73,0±51,5a	0,0±0,0b
6ª	40,6±12,1a	13,2±12,2b	87,0±74,2a	3,8±6,4b	96,0±61,2a	3,2±5,2b
7ª	28,4±9,8a	8,8±12,0b	36,0±12,7a	7,4±10,1b	111,4±73,1a	5,0±10,1b
8ª	28,4±5,0a	9,4±12,9b	25,2±9,8a	3,0±5,2b	78,4±67,5a	5,0±7,2b
9ª	30,6±9,7a	0,0±0,0b	24,0±3,7a	0,0±0,0b	33,8±11,79a	0,0±0,0b
Média	50,8±41,4a	29,6±28,8b	47,6±39,8a	13,2±18,6b	81,1±54,8a	21,1±38,5b

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre médias (P<0,05), usando o Teste de Tukey.

A expressão do gene defensina 1 em abelhas coletadas em colmeias expostas a DS do inseticida fipronil não foi alterada, em comparação ao grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6. Médias e desvio padrão da quantificação relativa do gene defensina I em *Apis mellifera* africanizadas coletadas em colônias que receberam xarope de açúcar puro (controle) ou contaminado com a dose subletal (DS) do inseticida fipronil ($8\mu\text{g L}^{-1}$).

Tratamento	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
Controle	0,99±0,55a	0,92±0,45a	1,14±0,67a	0,82±0,54a
DS ($8\mu\text{g L}^{-1}$)	0,97±0,46a	0,90±0,64a	0,88±0,88a	0,70±0,67a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre médias ($P<0,05$) usando o Teste de Tukey.

4. Discussão

Os resultados para a DL_{50} de ingestão e contato indicaram alta toxicidade do inseticida fipronil para *A. mellifera* africanizadas. De acordo com Johansen e Mayer (1990) os inseticidas são considerados altamente tóxicos para abelhas quando apresentam DL_{50} inferior a $2\mu\text{g}$ por abelha. Os resultados obtidos são semelhantes aos relatados por Defra (2007) que obteve DL_{50} de ingestão de $0,12\mu\text{g/abelha}$ e Mayer e Lunden (1999) que obtiveram DL_{50} de contato de $0,013\mu\text{g/abelha}$.

Os ingredientes inertes, presentes em formulações comerciais de agrotóxicos, são responsáveis por potencializar o efeito dos ingredientes ativos e de acordo com Ciarlo et al. (2012) podem ser tóxicos para as abelhas. Apesar disso, no presente estudo optou-se pela utilização da formulação comercial do fipronil que é utilizada nas pulverizações em campo, a fim de simular da maneira mais próxima possível a exposição das abelhas a esses produtos.

As alterações comportamentais das abelhas, observadas durante os testes de toxicidade, incluíram agitação, convulsão, tremores e paralisia. Essas alterações podem ser devido à ação antagônica do fipronil sobre o neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA), que atua impedindo a entrada dos íons Cl^- nas células nervosas de insetos intoxicados, causando atividade neural excessiva (Narahashi et al. 2010).

Demonstrou-se que abelhas sofreram alteração na atividade motora após serem expostas por ingestão ou contato à DL_{50} e à DS do inseticida fipronil. A atividade locomotora em insetos é regulada pela sinalização GABAérgica que pode ser bloqueada devido a ligação do fipronil ao neurotransmissor GABA (Narahashi et al. 2010), o que justifica os resultados obtidos neste estudo. A redução da atividade motora observada nos diferentes tempos avaliados indica uma ação prolongada desse inseticida sobre o sistema nervoso dos insetos, ou pode estar relacionada à degradação do fipronil em metabólitos sulfona e disulfenil, que também podem prejudicar a atividade motora (Hainzl et al. 1998). Alterações na atividade locomotora em abelhas expostas por contato a DS de 0,00001 µg fipronil foram relatadas por Aliouane et al. (2009).

A exposição das abelhas ao fipronil durante a coleta de néctar, pólen, resinas e água, bem como sua presença em colônias de *A. mellifera* (Mullin et al. 2010; Pareja et al. 2011; Lambert et al. 2013) representa risco para esses polinizadores, que podem sofrer alterações comportamentais e ter a atividade motora prejudicada. De acordo com Aliouane et al. (2009), as modificações de uma ou mais funções das abelhas pode prejudicar a atividade de forrageamento e comprometer sua sobrevivência.

Não se observou diferença no consumo de xarope de açúcar fornecido às colônias contendo a DS do fipronil em relação ao grupo controle, indicando ausência de efeitos anti-alimentares ou repelentes desse inseticida para as abelhas. Esse fato pode contribuir para a exposição repetida das abelhas a esse inseticida em campo, ocasionando o acúmulo de recursos contaminados em colmeias, como verificado em estudos realizados por Pareja et al. (2011).

Nos testes de campo, verificou-se progressiva redução da viabilidade de cria, desenvolvimento populacional e alterações comportamentais nas abelhas adultas em enxames expostos à DS do fipronil. Esses resultados possivelmente se devem a utilização de alimento contaminado com fipronil para alimentar as larvas em desenvolvimento e ao consumo repetido de alimento contaminado pelas abelhas adultas. O fipronil pode ter sido degradado no decorrer do estudo, da mesma forma que ocorre quando aplicado em campo, dando origem aos metabólitos sulfona e disulfenil que também apresentam alta toxicidade (Hainzl et al. 1998).

O fornecimento de xarope de açúcar contaminado com a DS do fipronil durante o período do inverno garantiu sua utilização imediata pelas abelhas, já que nesse

período não existem outras fontes de néctar disponíveis na área de estudo. Em períodos de floradas, possivelmente as abelhas coletariam néctar na vegetação nativa, interferindo nas análises para a avaliação dos efeitos da DS. A exposição de enxames à DS do fipronil no período do inverno revelou alta toxicidade desse inseticida para as abelhas adultas e em desenvolvimento. Deve-se considerar que no inverno as abelhas apresentam maior longevidade (Page e Peng 2001) e consomem recursos estocados nas colônias, aumentando sua exposição a agrotóxicos. A maior perda de enxames no inverno (Oldroyd 2007; Williams et al. 2010; Kaplan 2014), pode estar relacionada ao efeito de doses subletais do inseticida fipronil.

A exposição dos enxames ao fipronil e sua utilização pelas abelhas pode prejudicar diversas atividades na colônia. A coleta de recursos pode ser prejudicada devido a alterações na atividade motora de abelhas campeiras, que ao consumir os recursos contaminados apresentam maior letargia. Alterações motoras podem ser mais intensas em períodos de escassez de floradas, quando as abelhas são expostas à DS de fipronil presente em alimentos contaminados, devido às repetidas exposições ao inseticida.

O neurotransmissor GABA que é afetado pelo fipronil também regula a contração muscular das abelhas (Narahashi et al. 2010), importante na geração de calor para manutenção da temperatura dos enxames. Devido ao resfriamento do ambiente no inverno, os enxames expostos a DS do fipronil podem ter o aquecimento do ninho comprometido, prejudicando a criação das larvas. O desenvolvimento das abelhas em colônias expostas a DS do fipronil também pode ser prejudicado, devido à alta toxicidade desse inseticida para abelhas adultas e para larvas, conforme resultados apresentados no presente estudo.

A progressiva redução do número de abelhas adultas nas colônias expostas a DS do fipronil, em função do comprometimento do desenvolvimento populacional das colônias, ausência de abelhas mortas no interior ou nas proximidades das colmeias, abandono dos enxames pelas abelhas adultas deixando estoques de mel e pólen, observados no presente estudo assemelham-se ao fenômeno Colony Collapse Disorder (CCD) descrito por Van Engelsdorp et al. (2009). Estudo conduzido por Lu et al. (2012) verificaram que a exposição de enxames a DS de inseticida prejudicou o desenvolvimento das colônias, seguida do seu abandono. É importante destacar que as

colônias do grupo controle utilizadas no presente estudo mantiveram desenvolvimento inalterado e se mantiveram ativas até a 20ª semana de avaliação. Esse dado confirma que a perda dos enxames do grupo tratamento foi devida à exposição à DS do fipronil. As observações realizadas nesse estudo reforçam as suspeitas de que doses subletais de inseticidas podem ocasionar ou facilitar a ocorrência do fenômeno Colony Collapse Disorder (CCD), conforme sugerido por Van Engelsdorp et al. (2009) e Lu et al. (2012).

A utilização de agrotóxicos em cultivos agrícolas pode contribuir para a contaminação de todos os recursos coletados pelas abelhas, devido à dispersão desses produtos pelo vento durante sua aplicação. Considerando a presença do fipronil em colônias de abelhas abandonadas, nas quantidades entre 40 a 100 µg kg⁻¹ e 150 a 170 µg kg⁻¹ em amostras de mel e abelhas, respectivamente (Pareja et al. 2011) e sua detecção em menores doses em estudos realizados por Mullin et al. (2010), Pareja et al. (2011) e Lambert et al. (2013), os resultados do presente estudo demonstram a importância da adoção de estratégias que visem reduzir sua utilização.

Em países da União Europeia a taxa de aplicação do fipronil varia entre 17,5 a 44g/i.a/ha, sendo que os cultivos tratados com essa quantidade de ingrediente ativo apresentaram respectivamente 2,3 e 6,4 µg do fipronil kg⁻¹ no pólen (European Food Safety Authority 2013) o que confirma a exposição dos polinizadores a esse inseticida em doses subletais. O uso do fipronil em doses entre 80 a 400g/i.a/ha em países da América Latina (BASF The Chemical Company 2014) representa grandes riscos para os polinizadores, devido à alta concentração desse inseticida que podem estar presentes em recursos coletados por esses insetos.

A expressão do gene defensina 1 não foi alterada em abelhas coletadas nas colmeias expostas a DS do fipronil ao longo do estudo. O gene defensina 1 codifica a expressão de um peptídeo antimicrobiano do sistema imunológico das abelhas, sendo que a redução da sua expressão pode tornar as abelhas mais suscetíveis ao ataque de microrganismos (Ilyasov et al. 2012). As abelhas são normalmente expostas a microrganismos encontrados naturalmente nas colônias (Evans et al. 2006), o que proporciona um desafio para as abelhas, tornando necessária a síntese de proteínas de defesa. A coleta de abelhas diretamente nas colônias para posterior análise da expressão do gene defensina 1 dispensou a exposição artificial das abelhas a microrganismos.

Futuros estudos são sugeridos visando avaliar a expressão de genes do sistema imunológico de abelhas expostas a doses subletais de inseticidas utilizados em cultivos agrícolas e na presença de parasitas causadores de doenças em abelhas, como o ácaro *V. destructor* e patógenos como *Nosema sp.*, que de acordo com Connolly (2013) podem prejudicar a sanidade das abelhas. Estudos realizados por Boncristiani et al. (2012) verificaram alteração da expressão de genes do sistema imunológico em abelhas expostas doses subletais de acaricidas e na presença do ácaro *V. destructor*.

A alta toxicidade do fipronil para os polinizadores levou países como a França, Itália, Alemanha e Eslovênia a proibirem sua utilização (Ghisi et al. 2011). Os resultados apresentados no presente estudo demonstram os riscos da utilização do fipronil para *A. mellifera*, comprovando a ocorrência de alterações comportamentais e locomotoras. Além disso, o desenvolvimento e manutenção de colônias expostas à dose subletal do fipronil foi comprometido, culminando no colapso e abandono dos enxames. Diante dos resultados apresentados, sugere-se a revisão da autorização do uso do fipronil em países onde é autorizado.

Estudos em longo prazo para detecção de efeitos tóxicos de doses subletais de agrotóxicos a que as abelhas são expostas são sugeridos a partir dos resultados apresentados no presente estudo. É importante que esses estudos sejam realizados em períodos críticos para a sobrevivência das abelhas, como no inverno, quando os recursos potencialmente contaminados por agrotóxicos são consumidos pelas abelhas.

A avaliação da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas considerando seus efeitos subletais durante o inverno, pode contribuir para melhor entendimento do declínio dos polinizadores, permitindo a adoção de estratégias que reduzam a exposição das abelhas a essas substâncias, como descritas por Hooven et al. (2013). A redução mundial do número de enxames de *A. mellifera* pode prejudicar a polinização de cultivos agrícolas e áreas de vegetação nativa (Aizen e Harder 2009) sendo fundamental reduzir a utilização de inseticidas altamente tóxicos, que são responsáveis pelo declínio desses polinizadores.

Conclui-se que o fipronil apresenta efeitos altamente tóxicos para as abelhas *Apis mellifera*, ocasionando alterações que podem contribuir para o colapso das colônias, devendo ser estudadas medidas que possibilitem sua substituição por produtos com menor toxicidade para esses polinizadores.

Referências

- Aizen, M.A., Harder, L.D. (2009) The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* **19**, 915-918.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.G., Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (1), 113-122.
- Al-Tikrity, W.S., Hillman, R.C., Benton, A.W., Clarke J. R. (1971) A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. *Am. Bee J.* **111** (1), 20-26.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., et al. (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* **2**, 326.
- Basf, The Chemical Company (2014). Inseticides. Regent® 800 WG [online] http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/insecticides/insecticides_product/Regente_800_WG (accessed on 13 March 14).
- Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., Van Engelsdorp D. (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* **58** (5), 613-620.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford. MF, Zulich, A.W., et al. (2010) Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One.* **5**, e13181.
- Ciarlo, T.J., Mullin, C.A., Frazier, J.L., Schmehl, D.R. (2012) Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS One.* **7** (7), e40848.

- Colin, M.E., Bonmatin, J.M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., Vermandere, J.P. (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **47** (3), 387-395.
- Connolly, C.N. (2013) The risk of insecticides to pollinating insects. *Commun. Integr. Biol.* **6**, e25074.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J., Gauthier, M. (2011) Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*. **20** (2), 429-437.
- Defra (2007) Assessment of the risk posed to honeybees by systemic pesticides. Project PS2322. CSL, York, UK.
- European Food Safety Authority (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA J.* **11** (5), 3158.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **15** (5), 645-656,
- Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A.M.P., Galleto, L., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J.J.G. (2009) Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*. **40** (3), 332-346.
- Frommberger, M., Pistorius, J., Schier, A., Joachimsmeier, I., Schenke, D. (2012) Guttation and the risk for honey bee colonies (*Apis mellifera* L.): a worst case semi-field scenario in maize with special consideration of impact on bee brood and brood development. *Julius-Kühn-Archiv*. **437**, 71-76.

- Gallai, N., Salles, J-M., Settele, J., Vaissière, B.E. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* **68** (3), 810-821.
- Ghisi, N.C., Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V., Almeida, M.I., Ribeiro, C.A., Cestari, M.M. (2011) Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with fipronil. *Environ. Monit. Assess.* **180** (1-4), 589-599.
- Hainzl, D., Cole, L.M., Casida, J.E. (1998) Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* **11** (12), 1529-1535.
- Hooven, L., Sagili, R., Johansen, E (2013) How to reduce bee poisoning from pesticides. Oregon State University Extension Service, 1 PNW 591 [online] <http://wasba.org/how-to-reduce-bee-poisoning-from-pesticides-pnw-591/> (accessed on 18 March 14).
- Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., Nikolenko, A. (2012). Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. *J. Apic. Sci.* **56** (1), 115-124.
- Johansen, C.A., Mayer, D.F. (1990) Pollinator protection: a bee & pesticide handbook. Wicwas Press, Cheshire, USA.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity-USA. *Apidologie.* **41** (3), 312-331.
- Kaplan, K. (2014) Fact sheet: survey of bee losses during winter of 2012/2013 [online] <http://www.ars.usda.gov/is/br/beelosses/index.htm> (accessed on 17 March 14).

- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., et al. (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. *PLoS One*. **8** (6), e67007.
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **48**, 129-134.
- Lu, C., Warchol, K.M., Callahan, R.A. (2012) In situ replication of honey bee colony collapse disorder. *Bull. Insectol.* **65** (1), 99-106.
- Mayer, D.F., Lunden, J.D. (1999) Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *J. Apic. Res.* **38** (4), 191-197.
- Minitab Inc. (2001). Minitab 13. Minitab Inc., State College, PA.
- Miranda, J. E, Navickiene, H.M.D., Nogueira-Couto, R.N., De Bortoli, S.A., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Furlan, M. (2003) Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae) *Apidologie*. **34** (4) 409-415.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Van Engelsdorp, D., Pettis, J.S. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*. **5** (3), e9754.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L., Yeh, J.Z. (2010) Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic. Biochem. Physiol.* **97** (2), 149-152.
- Oldroyd, P.B. (2007) What's killing American honey bees? *PLoS Biol.* **5** (6), e168.

- Page Jr, R., Peng, C.Y.S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36** (4), 695-711.
- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio, M.V., Heinzen, H. (2011) Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **8** (10), 3844-3858.
- Pennsylvania State University (2011) A field guide to honey bees and their maladies. [online] <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/PDFs/AGRS116.pdf/> (accessed on 09 March 14).
- Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29** (9), e45.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* **25** (6), 345-353.
- Scharlaken, B., De Graaf, D.C., Goossens, K., Peelman, L.J., Jacobs F.J. (2008) Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* **32** (8), 883-889.
- Stokstad, E. (2007) The case of the empty hives. *Science.* **316** (5827), 970-972.
- Thompson, H.M., Hunt, L.V. (1999) Extrapolating from honeybees to bumble bees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology.* **8** (3), 147-166.
- Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., King, W.J. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **176**, 1-66.

- Van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., et al. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*. **4** (8), e6481.
- Van Engelsdorp, D., Meixner, M.D. (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S80-S95.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B., et.al. (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*. **6** (6), e21550.
- Williams, G.R., Tarpy, D.R., Van Engelsdorp, D., Chauzat, M.P., Cox-Foster D.L, et al. (2010) Colony collapse disorder in context. *Bioessays*. **32** (10), 845-846.
- Zar, J.H. (2010) Biostatistical analysis. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

CAPÍTULO III

Implicações

As abelhas são os principais agentes polinizadores em cultivos agrícolas e áreas de vegetação nativa, além de terem grande importância na produção apícola. Apesar da sua importância, grandes perdas de colônias vêm sendo registradas mundialmente, estando a ampliação do uso de agrotóxicos entre as principais causas desse fenômeno. A contaminação do ambiente por agrotóxicos normalmente expõe as abelhas e suas colônias a efeitos deletérios. Atualmente os testes para a liberação do uso de agrotóxicos consideram apenas sua toxicidade aguda para as abelhas, obtida em testes de laboratório, sem considerar os prejuízos que podem ser decorrentes da exposição repetida desses polinizadores a doses subletais e seus efeitos sobre as colônias.

A utilização de agrotóxicos sistêmicos e não sistêmicos para o combate a pragas expõem os polinizadores a essas substâncias, devido a sua alta persistência no ambiente e a contaminação dos recursos (néctar, pólen, resinas e água) coletados pelas abelhas. A aplicação aérea de agrotóxicos, prática comum em grandes áreas de monocultivos, pode agravar essa exposição.

Estudos aprofundados dos efeitos de agrotóxicos (considerando efeitos letais e subletais, em laboratório e campo) para as abelhas podem contribuir para reavaliação da autorização do uso de produtos altamente tóxicos, visando reduzir os impactos da sua utilização. Esses estudos também podem contribuir para o entendimento do declínio dos polinizadores registrado em diversos países nos últimos anos. A ampliação de estudos que avaliem a exposição das abelhas a agrotóxicos é fundamental, pois pode contribuir para avaliação dos riscos e impactos ecológicos e econômicos dessas substâncias, além de estimular a indústria química a desenvolver produtos mais específicos para o combate a pragas e que sejam menos nocivos aos polinizadores.

Futuros estudos para avaliar o efeito da exposição de abelhas a doses subletais de agrotóxicos e agentes patogênicos são sugeridos, a fim de avaliar o impacto de agentes químicos e biológicos sobre o desenvolvimento e manutenção de colônias. A exposição de colônias a múltiplos agrotóxicos, para avaliação de efeitos sinérgicos dessas substâncias também é sugerida. Estudos da aprendizagem olfatória, percepção gustativa e análise da expressão de genes do desenvolvimento, desintoxicação e sistema imunológico também devem ser aprofundados em abelhas expostas a agrotóxicos.