

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

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO SOBRE O SISTEMA
ANTIOXIDANTE DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS A
FUNGICIDA DE AÇÃO TRIPLA**

Tainá Angelica de Lima Freitas

Médica Veterinária

2023

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

**INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO SOBRE O SISTEMA
ANTIOXIDANTE DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS A
FUNGICIDA DE AÇÃO TRIPLA**

Tainá Angelica de Lima Freitas

Orientador Prof. Dr. Daniel Nicodemo

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

2023

F866i

Freitas, Tainá Angelica de Lima

Influencia da nutrição sobre o sistema
antioxidante de abelhas melíferas expostas a
fungicida de ação tripla / Tainá Angelica de Lima
Freitas. -- Jaboticabal, 2024

55 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Nicodemo

1. Extresse oxidativo. 2. Abelhas. 3. Fungicidas. I.

Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

O presente trabalho aborda os desafios socioeconômicos e ambientais que o mundo enfrenta. Entre esses desafios, a proteção da biodiversidade e a sustentabilidade agrícola têm sido áreas de foco significativas. Esta pesquisa explora o impacto na relação entre fungicidas e abelhas melíferas, destacando a importância de conciliar práticas agrícolas modernas com a preservação de insetos com valores socioeconômicos alto. Cerca de 75% das principais culturas alimentares do mundo dependem, em algum grau, da polinização por insetos, sendo as abelhas as principais polinizadoras. Assim, qualquer ameaça às populações de abelhas pode ter consequências sérias para a segurança alimentar global. Os fungicidas são amplamente utilizados na agricultura para proteger as plantações contra doenças fúngicas, mas seu uso indiscriminado pode resultar em efeitos colaterais prejudiciais para os polinizadores, como as abelhas melíferas. Estudos têm demonstrado que a exposição a certos fungicidas pode comprometer a saúde das abelhas, afetando suas capacidades de forrageamento, orientação e até mesmo a fertilidade. Para conciliar a necessidade de proteger as plantações contra “pragas” e garantir a saúde das abelhas, é crucial adotar abordagens agrícolas sustentáveis. Isso inclui a implementação de práticas de manejo integrado de pragas, redução do uso de produtos químicos prejudiciais e a promoção de métodos orgânicos de cultivo. O enfrentamento dos desafios relacionados aos fungicidas e abelhas melíferas à luz dos objetivos de desenvolvimento sustentável destaca a necessidade de uma abordagem equilibrada entre a produção agrícola e a preservação da biodiversidade. Ao alinhar as práticas agrícolas com os princípios dos ODS, podemos criar um futuro sustentável, onde a segurança alimentar coexiste harmoniosamente com a proteção do meio ambiente e das espécies essenciais.

Potential impact of this research

This work addresses the socioeconomic and environmental challenges that the world faces. Among these challenges, biodiversity protection and agricultural sustainability have been significant areas of focus. This research explores the impact on the relationship between fungicides and honey bees, highlighting the importance of reconciling modern agricultural practices with the preservation of insects with high

socioeconomic values. Around 75% of the world's major food crops depend, to some degree, on pollination by insects, with bees being the main pollinators. Thus, any threat to bee populations could have serious consequences for global food security. Fungicides are widely used in agriculture to protect crops against fungal diseases, but their indiscriminate use can result in harmful side effects for pollinators such as honey bees. Studies have shown that exposure to certain fungicides can compromise the health of bees, affecting their foraging capabilities, orientation and even fertility. To reconcile the need to protect crops against “pests” and ensure the health of bees, it is crucial to adopt sustainable agricultural approaches. This includes implementing integrated pest management practices, reducing the use of harmful chemicals, and promoting organic farming methods. Addressing challenges related to fungicides and honey bees in light of sustainable development goals highlights the need for a balanced approach between agricultural production and biodiversity preservation. By aligning agricultural practices with the principles of the SDGs, we can create a sustainable future where food security coexists harmoniously with the protection of the environment and essential species.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ABELHAS MELÍFERAS EXPOSTAS A FUNGICIDA DE AÇÃO TRIPLA

AUTORA: TAINÁ ANGELICA DE LIMA FREITAS

ORIENTADOR: DANIEL NICODEMO


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

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL NICODEMO**
Data: 13/12/2023 18:06:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **FÁBIO ERMINIO MINGATTO**
Data: 13/12/2023 11:47:27-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO DE OLIVEIRA ORSI**
Data: 13/12/2023 17:44:57-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Assoc. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 12 de dezembro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TAINÁ ANGELICA DE LIMA FREITAS – Nascida em 16 de março de 1997, em Andradina –São Paulo. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina (FCAA) em 2020 e integrante do grupo de estudos NOS – Núcleo de Operações Sustentáveis. Em 2021 ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, na área de Nutrição Animal, orientada pelo Prof. Dr. Daniel Nicodemo.

Apoi Financeiro

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

Sumário

1.CAPÍTULO 1- Considerações gerais	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 A importância da nutrição para o bom desenvolvimento de colônias de abelhas melíferas.....	3
1.3 Toxicidade dos fungicidas para as abelhas	6
1.4 Estresse oxidativo em abelhas	8
2. Objetivos.....	10
Referências.....	11
2. CAPÍTULO 2- Suplementação alimentar não impede o estresse oxidativo causado por bixafen, prothioconazol e trifloxistrobina em abelhas melíferas.....	17
2. CHAPTER 2-Food supplementation does not prevent oxidative stress in honey bees exposed to bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin.....	17
2.1 Introdução.....	18
2.2 Material e metodos.....	19
2.2.1 Local do experimento.....	19
2.2.2 Definição das doses experimentais dos fungicidas em avaliação.....	19
2.3 Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas.....	23
2.4 Coleta de abelhas das colônias experimentais e contaminação por contato.....	24
2.5 Obtenção do homogenato do tórax e dosagem de proteínas.....	24
2.6 Avaliação do estresse oxidativo	25
2.6.1 Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx).....	25
2.6.2 Atividade da enzima catalase (CAT)	25
2.7 Concentração de antioxidantes não enzimáticos.....	25
2.7.1 Determinação da concentração de glutaciona reduzida (GSH).....	25

2.7.2 Determinação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG).....	26
2.7.3 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	26
2.8 Avaliação da lipoperoxidação	26
2.9 Análises estatísticas.....	27
3. Resultados.....	27
3.1 Quantificação dos p. a. na calda de pulverização e nas abelhas melíferas.	27
3.2 Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas.....	28
3.3 Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT).....	29
3.4 Ensaio de glutathiona.....	30
3.5 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	31
3.6 Avaliação da lipoperoxidação.....	31
4. Discussão.....	34
4.1 Análise da calda de aplicação e níveis de exposição das abelhas aos p. a.	34
4.2 Manejo alimentar das colônias melíferas.....	34
4.3 Estresse oxidativo em abelhas expostas aos fungicidas	35
5. Conclusão	38
Referências.....	38

**METABOLISMO ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
ABELHAS MELÍFERAS BEM E MAL NUTRIDAS E INTOXICADAS
COM FUNGICIDA DE AÇÃO TRÍPLICE**

RESUMO

A utilização de fungicidas com mais de um princípio ativo (p. a.) pode favorecer o controle de fungos patogênicos; porém, pode impactar o desenvolvimento de colônias de abelhas que estão presentes nas áreas onde estes agrotóxicos são utilizados. Contudo, há de se considerar o estado nutricional destes insetos, haja vista que deficiências nutricionais podem implicar em maior suscetibilidade a agentes estressores, como os fungicidas. Neste estudo, foi avaliado se a suplementação alimentar de colônias de abelhas melíferas pode mitigar o estresse oxidativo causado pelos fungicidas bixafen, protioconazol e trifloxistrobina em abelhas campeiras. Foi realizado um experimento para determinar as doses destes p. a. que podem contaminar as abelhas por contato quando da aplicação de fungicida comercial que contém os três p. a. é realizada de acordo com as recomendações agronômicas. Em seguida, oito colônias de abelhas melíferas, instaladas em colmeias Langstroth, no apiário da Unesp, Câmpus de Dracena, foram divididas em dois grupos. As colônias do primeiro grupo tiveram sua alimentação suplementada por 14 semanas. Neste período não foram oferecidos suplementos para o segundo grupo de colônias, que tiveram a disponibilidade de alimento proteico reduzida em função da instalação de coletores de pólen. Após o período de manejo alimentar, foram obtidos pools de abelhas campeiras dos dois grupos, que foram expostas às doses estabelecidas de 1 e 7 μg Indivíduo^{-1} de cada p. a. isoladamente ou em associação. Decorridas 48 horas da exposição aos p. a., foi obtido homogenato dos tórax das abelhas para a avaliação do metabolismo oxidativo. Os p. a., isolados ou em associação alteraram a atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase e a concentração de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona dissulfeto (GSSG), relação GSH:GSSG, estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina e concentração de malondialdeído. A suplementação alimentar não contribuiu para redução dos efeitos do estresse oxidativo das abelhas melíferas expostas aos fungicidas.

Palavras-chave: bixafen, catalase, nutrição, protioconazol, trifloxistrobina.

**ENERGETIC METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS IN HONEY BEES WELL
AND POORLY NOURISHED AND CONTAMINATED WITH A TRIPLE ACTION
FUNGICIDE**

ABSTRACT

The use of fungicides with more than one active ingredient (a. i.) can favor the control of pathogenic fungi but can impact the development of bee colonies that are present in areas where these pesticides are used. However, the nutritional status of these insects must be considered, given that nutritional deficiencies can result in greater susceptibility to stressors, such as fungicides. In this study, it was evaluated whether food supplementation of honey bee colonies can mitigate the oxidative stress caused by the fungicides bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin in honey bee foragers. An experiment was carried out to determine the contact exposure doses of these a. i. in bees, when the application of a commercial fungicide that contains bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin is carried out in accordance with agronomic recommendations. In the following stage, eight colonies of honey bees installed in Langstroth hives at the Unesp apiary, Campus of Dracena were divided into two groups. The colonies in the first group had their food supplemented for 14 weeks. During this period, no supplements were offered to the second group of colonies, which had reduced protein food availability due to the installation of pollen traps. After the food management period, pools of forager bees from both groups were obtained, which were exposed to the established doses of 1 and 7 $\mu\text{g}\cdot\text{bee}^{-1}$ from each a. i. isolated or in association. 48 hours after exposure to the a. i., thoraxes homogenates were obtained from bees to evaluate oxidative metabolism. The a. i., isolated or in association, altered the activity of catalase and glutathione peroxidase enzymes and the concentration of reduced glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), GSH:GSSG ratio, oxidative state of pyridine nucleotides and malondialdehyde concentration. Food supplementation did not contribute to reducing the effects of oxidative stress in honey bees exposed to fungicides.

Keywords: bixafen, catalase, nutrition, prothioconazole, trifloxystrobin.

1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1. Introdução

São conhecidas cerca de 20.000 espécies de abelhas no mundo, sendo que aproximadamente 85% apresentam hábito solitário. No Brasil, é estimada a existência de 3.000 espécies de abelhas, sendo algumas de ocorrência restrita às regiões neotropicais (Barbosa et al., 2017). O menor grupo é o das abelhas eussociais, insetos que vivem em colônias, formada por rainha, zangões, responsáveis pela reprodução, e operárias, que são indivíduos que realizam funções específicas de acordo com o estágio de vida. Todas as abelhas dependem das plantas para obtenção do próprio alimento e para alimentarem a cria (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010). Na relação entre plantas e abelhas, os vegetais disponibilizam pólen, néctar e outros recursos úteis para o desenvolvimento das colônias e em troca são recompensadas pelo serviço de polinização (Couto e Couto, 2006).

A polinização é um importante serviço ambiental realizado pelos agentes polinizadores, com destaque para as abelhas. A polinização torna viável a propagação de várias espécies e ainda é benéfica para a manutenção da viabilidade genética de muitas espécies vegetais, que são a base das cadeias ecológicas terrestres. Dessa forma, as abelhas são indispensáveis para o equilíbrio ecológico no planeta Terra, inclusive beneficiando a população humana (Nates-Parra, 2005; Costa; Oliveira, 2014). Além de favorecer o equilíbrio da flora nativa, as abelhas são importantes para a produção de alimentos. Elas são responsáveis pela polinização de mais de 50% das plantas das florestas tropicais e no Cerrado brasileiro chegam a polinizar mais de 80% das angiospermas. Considerando as plantas cultivadas e utilizadas na alimentação humana, diretamente ou indiretamente, 73% são polinizadas pelas abelhas e, das 57 espécies vegetais mais plantadas no mundo, elas polinizam cerca de 42% (Freitas e Silva, 2015). A maioria das plantas utilizadas para produção de alimentos no Brasil depende do serviço de polinização. Este serviço prestado pelas abelhas foi estimado no valor de R\$ 43 bilhões em 2018, com destaque para as culturas de soja, café, laranja e maçã (Lima, 2019).

Além da importância dos serviços ecossistêmicos de polinização, a exploração das colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) permite a obtenção de produtos

apícolas, como mel, cera, própolis, pólen apícola, geleia real e apitoxina (Aguiar et.al, 2023). A apicultura é uma atividade rentável e pode ser desenvolvida em uma ampla variedade de ambientes, mesmo onde há outras atividades produtivas instaladas. Dessa forma, o apicultor pode ser um agente da sustentabilidade, favorecendo o desenvolvimento social, preservando a natureza e gerando renda. A criação de abelhas estimula a preservação da flora nativa de tal forma que, áreas restritas a outras práticas agropecuárias sejam legalmente exploradas por meio da apicultura (Nunes; Heindrickson, 2019). Em 2020, a produção brasileira de mel foi de 51,5 mil toneladas, representando um aumento de 12,5% quando comparada a 2019. Os estados do Sul lideram o ranking de produção de mel no país (IBGE, 2022).

As abelhas são consideradas insetos benéficos, ou seja, não há desvantagens na relação destes animais com outros seres vivos, exceto no que diz respeito ao comportamento defensivo das abelhas melíferas, que pode trazer risco à vida de pessoas (Souza et al., 2022) e no comportamento de visitação que pode danificar as flores, que pode ocorrer com abelhas irapuá (*Trigona spinipes*) (Lima et al., 2023). Além dos inúmeros benefícios decorrentes da presença destes insetos em ambientes nativos e de produção agrícola, estes insetos podem ser considerados indicadores de qualidade ambiental, face a sensibilidade que lhes é inerente, quanto as alterações provocadas em seu habitat. Isso geralmente é percebido quando há aplicação de agrotóxicos em áreas de cultivo agrícola nas quais as abelhas estão atuando como visitantes florais ou mesmo em áreas marginais que foram contaminadas com estes produtos por meio da deriva (Barbosa et. al, 2017; Böhme et al., 2017).

A evolução da agricultura tem favorecido a obtenção de grandes safras agrícolas nas últimas décadas e isso tem sido fundamental para atender a crescente demanda mundial por alimentos. Para tanto, tecnologias de adubação, irrigação, melhoramento genético, uso de agrotóxicos e cultivo de monoculturas têm sido constantemente desenvolvidas. Contudo, tais práticas não são sempre amigáveis às abelhas e, quando adotadas em associação, podem trazer prejuízos maiores às populações de abelhas (Gliessman, 2000; Aizen et al., 2019).

A expansão das áreas de monoculturas, como a soja, restringe a dieta das abelhas, oferecendo somente recursos monoflorais, contribuindo assim para a desnutrição das abelhas, em virtude da reduzida diversidade de recursos alimentares

disponíveis. Além do desmatamento que reduz o habitat natural das abelhas e outros animais, a monocultura traz como consequência ainda a ocorrência de períodos maiores de escassez de alimento, por causa da redução da diversidade floral no tempo (Vaudo et al., 2015).

A nutrição deficitária, assim como o consumo de alimentos contaminados com agrotóxicos, implica em graves prejuízos para as abelhas. A nutrição inadequada influencia na saúde e resistência das abelhas aos agentes estressores, pois o estágio nutricional das colônias é fundamental para a sobrevivência, reprodução, produção de mel e demais produtos apícolas (Pereira, 2010). O suporte nutricional adequado é muito importante para a manutenção da saúde de abelhas (Brodschneider e Crailsheim, 2010) e a alimentação deficitária implica em ajuste populacional das colônias, com redução do número de indivíduos e desarranjo da estrutura etária, que acaba interferindo negativamente na longevidade desses insetos (Klein et al., 2017). Segundo Tossi et al. (2017), a combinação de má nutrição das abelhas por falta de pólen, alimento proteico, e a exposição aos agrotóxicos pode ser problemática, considerando-se que boa nutrição pode ajudar as abelhas na resistência aos efeitos nocivos dos agrotóxicos se comparadas às abelhas mal nutridas.

1.2 A importância da nutrição para o bom desenvolvimento de colônias de abelhas melíferas

As abelhas são os insetos sociais que vivem em colônias organizadas, em que os indivíduos são divididos em castas. Cada casta possui funções bem definidas que são executadas visando a sobrevivência e perpetuação da família. Em condições favoráveis de clima, saúde e recursos alimentares, uma colônia pode conter dezenas de milhares de indivíduos, podendo ter mais de 50 mil abelhas. Para racionalizar o trabalho, as tarefas são divididas entre as castas. As operárias, mais numerosas, desempenham funções diferentes ao longo de sua vida adulta, que incluem limpar o ninho, alimentar a cria, transformar néctar em mel e construir favos, proteger a colônia e buscar água, alimento e matéria prima da própolis no campo. Os zangões estão presentes em menor número, geralmente menos que mil indivíduos, os quais são produzidos a fim de contribuir com a perpetuação da espécie localmente, não interferindo diretamente na produção de descendentes da própria colônia. A abelha

mais importante é a rainha, pois é única na colônia e é responsável pela ordem social e pela postura dos ovulos (Wiese, 2005).

Para que as colônias cresçam e sejam produtivas, as abelhas precisam consumir alimentos em quantidade adequada e que contenham todos os nutrientes essenciais, inerentes ao seu desenvolvimento. Para suprir suas necessidades nutricionais as abelhas procuram na flora apícola quantidade e qualidade de alimento necessária para toda colônia, buscando maior variedade de pólen e néctar nos vegetais nativos ou cultivados, determinando então a população de abelhas adultas e área de criação (Nicodemo et al., 2014).

Cada casta presente na colônia tem um tipo de alimento para o seu desenvolvimento e manutenção. A abelha rainha é diferenciada das operárias, em função do valor nutritivo do alimento que recebe desde a fase larval. Esta alimentação exclusiva de geleia real provocará maior desenvolvimento da glândula endócrina chamada *corpora allata* e então haverá produção de uma grande quantidade de hormônio juvenil. Dessa forma, a rainha tem o desenvolvimento completo dos seus ovários, sendo capaz de reproduzir e gerar descendentes machos e fêmeas (Arruda,2010).

As larvas de operárias e zangões recebem uma dieta menos nutritiva em relação às rainhas. Este alimento é uma mistura de geleia de operária ou zangão misturada com pólen, causando morte celular programada e, especificamente nas operárias, torna os ovários atrofiados, com menor capacidade reprodutiva, além de não apresentarem espermateca. Considerando o desenvolvimento holometabólico das abelhas, as crias necessitam mais de pólen do que as operárias, já que na fase inicial precisam mais de proteínas para sua formação estrutural, enquanto na fase de operárias necessitam mais de energia para voarem e realizar seu trabalho fora e dentro da colmeia (Alaux et.al, 2010).

Todas as abelhas necessitam de aminoácidos essenciais para um bom desenvolvimento, que são obtidos por meio do consumo de pólen. O polén é classificado como alimento proteico, com teor variando de 2,5 a 61% de proteína bruta, contendo ainda aminoácidos livres, lipídios e minerais. As abelhas coletam pólen de flores de várias espécies, visando que a qualidade proteica do pólen seja maior, (Roulston e Cane, 2000; Roulston et al., 2000). Existem dez aminoácidos essenciais

para as abelhas, são eles: a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano (De Groot, 1953; Cremonez, 2001).

Para que as colônias consigam atingir seu ótimo desenvolvimento, elas precisam obter pólen com teor médio de 20 a 23% de proteína bruta. A quantidade correta de aminoácidos junto com as proteínas é um fator chave para o desenvolvimento correto das abelhas. Em uma dieta de 20% de proteína digestível, as abelhas necessitam das seguintes porcentagens de aminoácidos essenciais: 3% de arginina, 2,5% de fenilalanina, 1,5% de histidina, 4% de isoleucina, 4,5% de leucina, 3% de lisina, 1,5% de metionina, 3% de treonina, 1% de triptofano e 4% de valina (De Groot, 1953; Herbert Jr. et al., 1977).

O néctar é uma solução açucarada produzida nos nectários florais, é a principal fonte de carboidratos e minerais, classificada como fonte de energia para as abelhas, após coletado das flores é transformado e armazenado nos alvéolos dos favos como mel e em épocas de escassez de néctar no campo ele pode ser utilizado. As abelhas adultas de todas as idades se alimentam de néctar o fornecimento adequado de alimento energético estimula a produção de cria (Cremonez, 2001). Os carboidratos presentes na dieta dos insetos atuam como fagoestimulantes, estimulando a ingestão de alimentos, esperando assim que as abelhas consumam maior quantidade de alimento quando a dieta é rica em carboidratos (Zucoloto, 1994).

A água tem o papel de transporte e dissolução de substâncias, serve de meio para reações químicas e refrigeração e manutenção da umidade do microambiente da colmeia (Batista et al., 2018). Para suprir suas necessidades nutricionais, as abelhas procuram na flora disponível em sua área de atuação alimento em quantidade e qualidade necessárias para toda a colônia, buscando maior variedade de pólen e néctar nos vegetais nativos ou cultivados para que a população de abelhas adultas seja saudável e numerosa (Nicodemo et al., 2014). Em períodos de escassez de alimentos é possível usar suplementos alimentares como xarope de sacarose (alimentação energética) e pasta proteica, para que as colônias não enfraqueçam, evitando crias e operárias doentes e controlando a entrada de inimigos naturais como traças e formigas (Embrapa, 2023).

O déficit de alimentação implica no declínio populacional nas colmeias e um desarranjo da estrutura etária, interferindo negativamente na longevidade desses

insetos (Schulz et al., 1998). Colônias que não conseguem todos os nutrientes essenciais, tem rainhas com menor possibilidade de ovoposição e menor resistência das crias (Brodschneider e Crailsheim, 2010). A má nutrição pode aumentar a suscetibilidade às doenças e parasitas e a ocorrência destes estressores pode agravar a situação de escassez alimentar da colmeia, pela ineficiência em realizar o trabalho das abelhas (Naug e Gibbs, 2009), o que pode levar a colônia à morte (Mayack e Naug, 2009).

Mesmo quando há alimento disponível no campo, as abelhas podem não estar bem nutridas. A ocupação de áreas cada vez maiores com monoculturas tem contribuído para o desequilíbrio alimentar das abelhas, pois, uma única fonte de pólen dificilmente apresenta todos os aminoácidos essenciais aos insetos e em proporções adequadas (Alaux et al., 2010). A oferta de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais influencia na quantidade de progênie produzida pela rainha, longevidade e saúde dos adultos e pela sobrevivência e produtividade da colônia. As colônias que enfrentam restrição de um ou mais nutrientes essenciais, como um aminoácido essencial, tem sua população diminuída e indivíduos adultos mais sujeitos aos agentes estressores, o que as tornam mais suscetíveis ao definhamento e colapso (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

1.3 Toxicidade dos fungicidas para as abelhas

Para combater pragas e doenças na agricultura são utilizados agrotóxicos, mas nem sempre estes produtos são aplicados da forma correta. O uso incorreto pode contaminar espécies animais e ou vegetais não alvo. Essas práticas agrícolas têm afetado os polinizadores e os constituintes dos agrotóxicos também acabam contaminando o solo, água e outros seres vivos (Margni et al., 2002; Godfray et al., 2014). Além disso, o uso descontrolado de agrotóxicos pode ocasionar seleção indireta de pragas, favorecendo a sobrevivência daquelas que se tornam resistentes a estes produtos sintéticos, além da morte de inimigos naturais dessas pragas e de agentes polinizadores, intensificando o desequilíbrio dos ecossistemas (Togni et al. 2019).

Os impactos negativos sobre as abelhas podem ser divididos em impactos letais ou subletais. No caso do efeito letal as abelhas morrem logo após à exposição

ao fungicida , principalmente quando as flores visitadas estão contaminadas. Esse efeito letal tem impacto significativo em populações de abelhas de várias espécies (Sgolastra et al., 2020). Já os efeitos subletais, que ocorrem quando as abelhas são expostas a qualquer agrotóxico e não ocorre a morte rápida, mas acaba tendo efeitos a longo prazo (Potts, 2010; Henry et al., 2012; Matsumoto, 2013). Essas doses subletais são tóxicas para as células do intestino médio das abelhas, induzindo autofagia e morte celular. A apoptose e a necrose podem ser identificadas por alterações na morfologia celular, enquanto a autofagia serve para degradação de componentes celulares que já estão prejudicados ocasionalmente por estresse metabólico e ambientais bem como a inseticidas (Moore et al., 2006).

O uso desenfreado de inseticidas neonicotinóides já foi apontado como uma das causas prováveis da Desordem do Colapso das Colônias, fenômeno mundialmente conhecido pela sigla CCD; um fenômeno caracterizado pela perda de abelhas que saem da colmeia para trabalhar mas não retornam para as suas colônias. Novos estudos apontam que herbicidas e fungicidas também podem contribuir para o desaparecimento das abelhas. Mesmo em doses subletais, os agrotóxicos podem resultar em efeitos prejudiciais, tornando crescente os problemas de desenvolvimento de colônias de apiários instalados em áreas onde ocorre pulverização area de cultivos agrícolas, com destaque para soja, cana-de-açúcar, laranja e algodão (Gussoni e Ribeiro,2017).

Segundo Rocha (2012), o comportamento das abelhas pode indicar que a colônia está sendo afetada por substâncias tóxicas, geralmente encontradas em cultivos que fazem uso de agrotóxicos. Alguns sinais como grande número de abelhas mortas próximos às colmeias, diminuição na produção de cria, menor atividade de forrageamento, abelhas mais defensivas, dificuldades na substituição natural da rainha, morte e má formação das larvas podem ser indícios de contaminação com xenobióticos.

A utilização de fungicidas tem como função o controle de fungos, que são filogeneticamente distantes dos insetos. Por isso, estes produtos não têm sido associados como fonte de risco eminente para os polinizadores. Tanto que, para muitos fungicidas comerciais, não há restrição de uso para as épocas de floração das culturas que necessitam ser tratadas e, em alguns casos, há a indicação de uso para

a época de floração, o que pode potencializar os danos ambientais, considerando-se que os visitantes florais são diretamente contaminados ou podem levar alimento contaminado para as colmeias (National Honey Bee Health Stakeholder, 2012).

Mesmo em doses baixas, os fungicidas podem resultar em efeitos letais para abelhas ou até prejuízos a longo prazo, como diminuição da postura pela rainha (Gussoni e Ribeiro, 2017), alterações comportamentais (Artz e Pitts-Singer, 2015; Tadei et al., 2019), redução da longevidade de adultos (Fisher et al., 2017), alterações celulares e da microbiota intestinal (DeGrandi-Hoffman et al., 2017; Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020) alterações no sistema imunológico (Cizelj et al., 2016), efeitos adversos semelhantes aos da má nutrição, que comprometem a colônia, tornando-a mais suscetível às infecções por patógenos (Degrandi-Hoffman et al., 2015) e inibição da respiração mitocondrial, que pode implicar em menor capacidade de realizar trabalho (Nicodemo et al., 2020).

Alguns estudos, como o da Bernauer et al. (2015), mostraram que o número de abelhas operárias em colônias de *Bombus impatiens* foi reduzido de uma média de 43,2 abelhas em gaiolas de controle para 12,2 indivíduos em gaiolas tratadas com o fungicida clorotalonil. Foi observada redução da biomassa total das colônias, que afeta diretamente a produção de novas rainhas. E o peso médio das rainhas-mãe entre as colônias tratadas com fungicida também teve redução significativa em relação aos controles, indicando que houveram consequências subletais do clorotalonil.

Em estudo realizado sobre os efeitos de alguns fungicidas sobre o crescimento e desenvolvimento de larvas de abelhas melíferas, Mussen et al. (2004), observaram que o fungicida Rovral®, cujo princípio ativo é uma dicarboximida, inibiu as proteínas quinases, resultando em comunicação intracelular inadequada, fazendo com que o desenvolvimento morfológico das pupas fosse alterado, resultando em maior mortalidade.

1.4 Estresse oxidativo em abelhas

A mitocôndria é uma importante organela celular, que capta algumas substâncias, como oxigênio e piruvato, e as converte em energia, na forma de ATP. Em abelhas, estão presentes em maior número nas células do sistema nervoso, do coração e tórax, pois há uma grande demanda de energia nessas partes do corpo

(Nicodemo et al., 2014). Nesta conversão de energia formam-se os radicais livres, produtos que são inevitáveis e uma vez formados dão início a uma reação em cadeia podendo doar ou aceitar elétrons de outras moléculas, tornando-as então oxidantes ou redutores (Korayem et al., 2012).

O estresse oxidativo é a geração descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria durante a respiração celular, as quais são formadas por diferentes vias metabólicas e em maior quantidade quando ocorre condições de estresse. Em condições normais existe um equilíbrio entre a geração de ERO e os processos antioxidantes, porém, quando ocorre o desequilíbrio da produção de radicais livres e do grau de proteção dos mecanismos antioxidantes, acontece o estresse oxidativo. Estressores exógenos como metais pesados, agrotóxicos e infecções bióticas podem ser os desencadeadores desse desequilíbrio (Balieira et.al, 2018).

O excesso de ERO pode resultar em peroxidação lipídica, que altera a fluidez da membrana celular e pode levar à apoptose, e causar danos oxidativos às proteínas que levam a modificações específicas de aminoácidos e quebra de peptídeos até a perda de atividade enzimática; afeta também o DNA, causando mutações, deleções de bases, degradação, cisão de fita simples e rearranjos (Yan et al., 2012). Para evitar os danos contra o estresse oxidativo, o organismo usa agentes antioxidantes como as vitaminas, minerais e enzimas, que restabelecem o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, conseguindo manter a integridade das membranas celulares e prevenindo danos oxidativo às biomoléculas (Woung et al., 2000).

As vitaminas C e E compõem o sistema de proteção antioxidante não enzimático, atuando como uma proteção das membranas lipídicas sobre os danos oxidativos. A manutenção dessas vitaminas em sua forma reduzida depende da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo contendo cisteína, que quando oxidada, produz a glutathiona dissulfeto (GSSG). A GSH é reduzida novamente pela ação da glutathiona redutase (GR), com NADPH como cofator (AVERILL-BATES, 2023). Porém, quando em condições de grande quantidade de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorrerá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG (Balieira et al. 2018). Por isto, a razão entre as concentrações de GSH/GSSG pode ser usada como marcador do estresse oxidativo (Owen; Butterfield

2010; Zitka et al., 2012).

A enzima catalase age sobre a eliminação do H₂O₂ citosólico, fazendo a sua catálise até água, mas quando presente nas mitocôndrias, o H₂O₂ é convertido a H₂O por meio da GSH por ação da glutathione peroxidase (GPx), formando um radical GS•, que produz, por dimerização, a GSSG, e a manutenção dos níveis de GSH é realizada pela atividade da glutathione redutase (GR), a qual utiliza os equivalentes redutores da NADPH, que é produzida pela via das Pentoses Fosfato ou por meio de enzimas transidrogenases. Portanto, A disponibilidade limitada da NADPH pode levar a aumento da GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (RIBEIRO et al., 2005).

Mesmo que a exposição da abelha ao fungicidas ocorra dê de forma indireta, resquícios deste agrotóxico podem estar presente em subdoses no pólen coletado (PETTIS et al., 2013) e essa exposição pode gerar problemas como a inibição da respiração mitocondrial, responsável pelo fornecimento energético para as funções vitais do inseto (NICODEMO et al., 2020).

2.Objetivos

Estudar se o manejo alimentar, no que se refere à suplementação energética e proteica da alimentação das abelhas em comparação à restrição proteica, pode interferir na resposta metabólica do sistema de defesa celular antioxidante de abelhas melíferas expostas por contato com três princípios ativos de ação fungicida, aplicados de forma isolada ou em associação.

Referências

Aguiar AS; Furtado EA; Rosa FL. (2023). A produção de mel apícola: importância socioeconômica e aspectos da cadeia produtiva - **Facit Business and Technology Journal**. 01: 229-245.

Aizen MA; Aguiar et al. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. **Global Change Biology**, 25:3516-3527.

Alaux C; Ducloz F; Crauser D; Le Conte Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*. **Apidologie**, 41: 278-294.

Arruda VM. (2010). **Efeito da cafeína no comportamento e na longevidade de operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Artz DR; Pitts-Singer TL. (2015). Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PLoS ONE**. 10(8) e0135688. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135688>>.

Averill-Bates, D.A. (2023). The antioxidant glutathione. **Vitamins and Hormones**, 121: 109-141.

Balieira KVB; Mazzo M; Bizerra PFV; Guimarães ARJS; Nicodemo D; Mingatto FE. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie**, 49:562–572.

Barbosa DB; Crupinski EF; Silveira RN; Limberger DCH. (2017). As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Rev. Elet. Cient. UERGS**, 3:4 694-703.

Bartlett DW; Clough L JM; Godwin JR; Hall AA; Hamer M; Parr-Dobrzanski B. (2002). The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, 58: 649–662.

Batista AC; Domingues CEC; Costa MJ; Silva-Zacarin ECM. (2020). Is astrobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**. 59:5 1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>>.

Batista MDCS; Pessoa RMS; Gois GC; Silva AAF; Lima CAB; Cunha DS. (2018). Alimentação das abelhas: revisão sobre a flora apícola e necessidades nutricionais. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, 14:1.

Bayer. Fox® Xpro: fungicida. (2019). São Paulo: **Bayer S. A.** Disponível em: <https://www.agro.bayer.com.br/-/media/bcs-inter/ws_brazil/atualizacao-bulas-26-06-2020/fox-xpro_bula.pdf> (acessado em 25 novembro 2020).

Bernauer OM; Gaines-Dias HR; Stefan SA. (2015). Colonies of Bumble Bees (*Bombus impatiens*) Produce Fewer Workers, Less Bee Biomass, and Have Smaller Mother Queens Following Fungicide Exposure. **Insects**, 478-488.

Böhme, F; Bischoff G; Zebitz CPW; Rosenkranz P; Wallner K. (2017). Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. **Apidologie**, 48:353-363.

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

Carneiro LS; Martinez LC; Gonçalves WG; Santana LM; Serrão JE. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target worker honey bees *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, article 109991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>>.

Costa CCA; Oliveira FL. (2014). Polinização: serviços ecossistêmicos e o seu uso na agricultura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 8:3 1-10.

Couto RHN; Couto LA. (2006). Apicultura: manejo e produtos. 3.ed. **Jaboticabal: FUNEP**. p. 191.

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

De Groot AP. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Comparative Physiology and Ecology**, 3:197-285.

DeGrandi-Hoffman G; Chen Y; Watkins DeJong E; Chambers ML; Hidalgo G. (2015). Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, 108:2518-2528. Disponível em: <<https://www.doi.org/10.1093/jee/tov251>>.

DeGrandi-Hoffman G; Corby-harris V; Dejong EW et al. (2017).Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, 48:340-352. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0478-y>>

Embrapa.(2023). **Alimentação das abelhas**.Embrapa Meio-Norte. Brasília-DF.

FAO. (2004). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: Freitas BM, Pereira JOP. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**.19-25.

Fisher A; Carvalho CU; Oliveira C; Ribeiro B; Oliveira J; Rangel E. (2017). Synergistic effects of almond protective fungicides on the survival of bee foragers (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 110, 802-808.Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/tox031>>.

Freitas BM; Silva CI. (2015).O papel dos polinizadores na produção agrícola. **Agricultura e polinizadores**. A.B.E.L.H.A. São Paulo-SP, 9-17.

Godfray HCJ et. al. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 281:20140558.

Gussoni WJ; Ribeiro GS. (2017). Abelhas x Agrotóxicos. **Informativo aos apicultores e meliponicultores**. 1-16.

Henry M; Béguin M; Requier F; Rollin O; Odoux JF; Aupinel P; Aptel J; Tchamitchian S; Decourtye A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science** (New York, N.Y.), 336(6079), 348–350. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1215039>>.

Herbert JR EW; Shimanuki H; Caron D. (1991). Optimum protein levels required by honeybees (Hymenoptera: Apidae) to initiate and maintain brood rearing. **Apidologie**, 8:141-146. Disponível em:<<https://doi.org/10.1051/apido:19770204>>.

IBGE.(2022). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária municipal**. IBGE. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/74>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

Imperatriz-Fonseca VL. (2010). Nunes-Silva P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. 10:4 59-62,

Klein S; Cabirol A; Devaud JM; Barron AB; Lihoreau M. (2017). Why bees are so vulnerable to environmental stressors? **Trends in Ecology & Evolution**, 32: 268-278.

Korayem AM; Khodairy MM; Abdel-Aal AA; El-Sonbaty AAM. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. **Journal of Biology and Earth Sciences**. Issue 2:B93-B109.

Lima AL. (2019).Relatório aponta a importância da polinização para a agricultura brasileira.**Portal Embrapa**.

Lima ZCM; Miranda PS; Pérez-Maluf R; Moreira AA. (2023). Pollinators or pillagers? What is the impact of flower visitors on the production of yellow passion fruit? **Journal of Apicultural Research**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2252132>>.

Margni M et.al (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 93:379–392.

Matsumoto T. (2013). Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. **Bulletin of Insectology**, 66: 1 1-9.

MayackC, Naug D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, 100: 185–188.

Moore MN, Allen JI, Somerfield PJ (2006) Autofagia: papel na sobrevivência ao estresse ambiental.**Science Direct**. 62:S420-S425.

Mussen EC; Lopez JE; Peng CYS. (2004).Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), **Environmental Entomolog** 33:1151–1154.

Nates-Parra G. (2005) Abejas silvestres y polinización. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**. Costa Rica, 75:7-20.

National Hone Bee Health. (2012). **Conference Steering Committee**. Report on the National Stakeholders Conference on Honey Bee Health. US Department of Agriculture, Washington, DC.

Naug D; GibbsA. (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. **Apidologie**, 40: 595–599.

Nicodemo D; Mingatto FE; Jong D; Bizerra PFV; Tavares MA; Bellini WC; Vicente EF; Carvalho A. (2020). Mitochondrial respiratory inhibition promoted by Pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental toxicology and chemistry**, 39:6 1267-1272.

- Nicodemo D; Malheiros EB; JONG D; Couto RHN. (2014). Increased brood viability and longer lifespan of honeybees selected for própolis production. **Apidologie**. Paris: Springer France, 45:2 269-275.
- Nunes SP; Heindrickson MA. (2019). Cadeia de mel no Brasil: análise a partir do sudeste Paranaense. **Brazilian journal of Development**, 9:950-967.
- Oliver R; Hewitt HG. (2014). *Fungicides in crop protection*. 2.ed. **Boston: CABI**. 189
- Owen JB; Butterfield DA. (2010). Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. **Methods in Molecular Biology**. 648:269-277.
- Pereira FM. (2005). Desenvolvimento de ração proteica para abelhas *Apis Mellifera* utilizando produtos regionais do nordeste brasileiro. **Teses.Fortaleza-CE**.192.
- Pereira FM. (2010). Alternativa de alimentação para abelhas. **Embrapa Meio-Norte**.Teresina-PI, 5.
- Pettis JS; Lichtenberg EM; Andree M; Stitzinger J; Rose R; Vanengelsdorp D. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One** 8:e70182.
- Potts SG; Biesmeijer JC; Kremen C; Neumann P; Schweiger O; Kunin WE. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, 25:6, 345-353. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1460911>>.
- Ribeiro SMR; Queiroz JH; PELUZIO MCG; Costa NMB; Matta SLP; Queiroz MELR. (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, 21: 3 133-149.
- Rocha MCLSA. (2012). Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. **Brasília: Ibama**.
- Roulston TH; Cane JH. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**, 222:1 187-209.
- Roulston TH; Buchmann SL; Cane JH. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? **Ecological Monographs**, 70:4 617–643.
- Schulz DJ; Huang ZY; Robinson GE. (1998). Effect of colony food shortage on the behavioral development of the honey bee, *Apis mellifera*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 42: 295–303.
- Sgolastra F; Medrzycki P; Bortolotti L; Maini S; Porróni C; Simin-Delso N; Bosch J. (2020). Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, 241. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>>
- Souza TC; Farias BES; Bernarde PS; Chiaravalotti Neto F; Frade DDR; Brilhante A F; Melchior LAK. (2022). Tendência temporal e perfil epidemiológico dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, 31(3):e2022025.

Tadei R; Domingues CEC; Malaquias JB; Camilo EV; Malaspina O; Silva-Zacarin ECM. (2019). Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, 9(1), 3277. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>.

Togni PHB et. al .(2019). Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic agriculture. **Neotropical Entomology** 48:175-185.

Tosi S; Nieh JC; Sgolastra F; Cabbri R; Medrzycki P. (2017). Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B**, 284: 20171711.

Vaudo AD; Tooker JF; Grozinger CM; Patch HM. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science** 10:133–141.

Wiese H. (2005). Apicultura Novos Tempos, 2ª Ed. – **Guaíba: Agrolivros**, 17.

Woung WY; Thomas CM; Merkus JM; Zielhuis GA. (2000). Steegers-Theunissen RP. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, 73:3 435-442.

Yan H; Meng F; Jia H; Guo X; Xu B. (2012). The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from *Apis cerana cerana*, **Journal of Insect Physiology**, 58:782-791.

Zitka O; Skalickova S; Gumulec J; Masarik M; Adam V; Hubalek J; Trnkova L; Kruseova J ; Eckschlager T; Kizek R. (2012). Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in pediatric tumor patients. **Oncology Letters**, 4: 1247-1253.

Zucoloto FS. (1994). Performance of *Apis mellifera* workers fed on natural and artificial diets (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 54: 4.

2. CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR NÃO IMPEDE O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR BIXAFEN, PROTIOCONAZOL E TRIFLOXISTROBINA EM ABELHAS MELÍFERAS

RESUMO

O sistema de defesa celular antioxidante atua para promover homeostase e favorecer a expressão do potencial intrínseco de cada indivíduo. Entretanto, fatores extrínsecos, como contaminação com agrotóxicos, podem promover desequilíbrio metabólico e trazer prejuízos à saúde. O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação de colônias de abelhas melíferas pode diminuir o impacto sobre o sistema oxidante quando os indivíduos são expostos por contato a três fungicidas de forma isolada ou em associação. De um mesmo apiário, quatro colônias tiveram sua alimentação suplementada com xarope energético e pasta proteica durante 14 semanas. Pelo mesmo período, outras quatro colônias não receberam suplementos e tiveram sua alimentação proteica reduzida, em função da instalação de coletores de pólen nos alvados das colmeias. As colônias do grupo com restrição alimentar não puderam utilizar cerca de 500g de pólen, quantidade equivalente a 60% do pólen coletado por estas colônias. Após o período de manejo alimentar, abelhas campeiras foram contaminadas por contato com 1 ou 7 µg de bixafen, protioconazol e trifloxistrobina, isolados ou em associação. Após 48h, as abelhas foram dissecadas, obtendo-se o homogenato dos tórax para a avaliação do estresse oxidativo. A atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase, assim como a concentração de glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), relação GSH:GSSG, estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina e concentração de malondialdeído foram alterados em função da exposição aos fungicidas. A suplementação alimentar não diminuiu os efeitos causados por bixafen, protioconazol e trifloxistrobina.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, catalase, glutathione, nutrição, restrição alimentar.

CHAPTER 2 – FOOD SUPPLEMENTATION DOES NOT PREVENT OXIDATIVE STRESS IN HONEY BEES EXPOSED TO BIXAFEN, PROTHIOCONAZOLE AND TRIFLOXYSTROBIN

ABSTRACT

The antioxidant cellular defense system acts to promote homeostasis and favor the expression of each individual's intrinsic potential. However, extrinsic factors, such as contamination with pesticides, can promote metabolic imbalance and harm health. The objective of this work was to verify whether supplementation of honey bee colonies can reduce the impact on the oxidant system when individuals are exposed through contact to three fungicides alone or in combination. From the same apiary, four colonies had their diet supplemented with energy syrup and protein paste for 14 weeks. During the same period, four other colonies did not receive supplements and had their protein intake reduced, due to the installation of pollen traps in the hive entrances. The colonies in the food restricted group were unable to use around 500g of pollen, an amount equivalent to 60% of the pollen collected by these colonies. After the food management period, forager bees were contaminated by contact with 1 or 7 µg of bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin, alone or in combination. After 48h, the bees were dissected, obtaining the thorax homogenate to evaluate oxidative stress. The activity of catalase and glutathione peroxidase enzymes, as well as the concentration of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), GSH:GSSG ratio, oxidative state of pyridine nucleotides and malondialdehyde concentration were altered as a result of exposure to fungicides. Food supplementation did not reduce the effects caused by bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin.

Keywords: *Apis mellifera*, catalase, dietary restriction, glutathione, nutrition.

2.1. Introdução

Os desafios para a manutenção de colônias de abelhas melíferas com famílias saudáveis e populosas pelos apicultores são cada vez maiores. As perturbações ambientais, considerando-se as alterações da vegetação natural, que continuam a ser desmatadas, e da paisagem agrícola, ocupada principalmente por monocultivos que implicam no uso de grandes quantidades de agrotóxicos para a obtenção de safras satisfatórias, têm implicado em perdas de produtividade e aumento da mortalidade de colônias (Brodschneider e Crailsheim, 2010, Steinhauer et al., 2018; Neov et al., 2019).

Diferente de outras atividades pecuárias que tem seu alimento provido pelos criadores, a alimentação de abelhas domesticadas ocorre naturalmente, ou seja, as abelhas recorrem às flores para obter os nutrientes necessários para a manutenção de suas colônias e estocam quantidades excedentes para que possam se alimentar em períodos de escassez de alimento no campo (Seeley, 1989; Tsuruda et al., 2021). Contudo, as alterações ambientais têm promovido problemas nutricionais para estes insetos, decorrentes da baixa diversidade alimentar inerente às áreas com alto nível de ação antrópica, que até dispõem de recursos alimentares para as abelhas; porém, podem não conter todos os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento das colônias (Filipiak et al., 2017; De Groot et al., 2021).

Aliado ao problema de quantidade e qualidade de alimento disponível no campo para o pleno desenvolvimento de colônias de abelhas melíferas, que pode implicar em maior suscetibilidade das colônias a estressores ambientais (DeGrandi-Hoffman et al., 2018), está a maior exposição destes insetos aos agrotóxicos, que são utilizados para controlar pragas e doenças agrícolas. O uso indiscriminado destes produtos tem implicado em maior suscetibilidade das abelhas a várias doenças (López et al., 2017; Glavinic et al., 2019; Thebeau et al., 2023), redução da longevidade (Castle et al., 2022) e ocasionado mortalidade aguda em massa das abelhas, em função do nível de exposição (Holder et al., 2018).

Dentre os agrotóxicos, grande atenção tem sido dada aos efeitos dos fungicidas nos últimos anos, pois estes produtos têm sido comumente encontrados em amostras de mel, pólen e cera (Fisher et al., 2017). Um dos fatores que contribui para a contaminação das abelhas com fungicidas é que alguns produtos comerciais

deste grupo são indicados para tratamentos fitossanitários durante o período de floração, no qual as abelhas podem ser expostas por contato no momento das pulverizações (Schuhmann et al., 2022). A exposição das abelhas aos fungicidas pode implicar em alterações comportamentais (Tadei et al., 2019), redução da longevidade (Fisher et al., 2017), alterações celulares e da microbiota intestinal (DeGrandi-Hoffman et al., 2017; Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020), alterações no sistema imune (Cizelj et al., 2016), efeitos adversos similares aos da má nutrição, que comprometem a colônia, tornando-a mais suscetível às infecções por patógenos (DeGrandi-Hoffman et al., 2015) e inibição da respiração mitocondrial, que pode implicar em menor capacidade de realizar trabalho (Nicodemo et al., 2020).

Buscando maior eficácia no controle de fungos patogênicos na agricultura, novos produtos têm sido desenvolvidos, com a associação de dois ou mais princípios ativos fungicidas (Oliver e Hewitt, 2014). Um exemplo é um fungicida comercial que contém os fungicidas bixafen, protioconazol e trifloxistrobina e é utilizado em grandes culturas, como soja, milho, girassol e algodão (BAYER, 2019). Embora essa estratégia possa se mostrar viável sob o ponto de vista agrônômico é preciso avaliar os prejuízos às abelhas decorrentes dessa múltipla exposição aos fungicidas.

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes que ocasiona geração excessiva de radicaislivres ou espécies reativas de oxigênio, causando um potencial dano oxidativo contra as células e tecidos, enquanto o sistema antioxidante tem como objetivo limitar esses níveis de espécies reativas intracelulares e prevenir danos subsequentes (Mele et al., 2006). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se abelhas com suplementação alimentar energética e proteica podem metabolizar os fungicidas bixafen, protioconazol e trifloxistrobina sem sofrer estresse oxidativo quando expostas por contato.

2.2 Material e Metodos

2.2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado na cidade de Dracena, Estado de São Paulo

(latitude 21°45'8" S e longitude 51°55'63" O), a uma altitude de 421 metros, entre dezembro de 2021 e abril de 2023.

2.2.2 Definição das doses experimentais dos fungicidas em avaliação

Para a definição das doses experimentais dos três princípios ativos (p. a.) a serem aplicados topicamente nas abelhas, foi realizado um experimento de pulverização de um fungicida comercial para se estimar o nível de contaminação das abelhas por contato quando a aplicação de um fungicida que contém os três p. a. é realizada de acordo com as recomendações agronômicas.

Em 50 vasos, com volume de 5L, preenchidos com solo de barranco corrigido com calcário e adubado (Raj et al., 1996), foram semeadas três sementes de soja, da cultivar TMG 7067. Três semanas após germinação, foi deixada apenas uma planta por vaso. Até o dia da avaliação, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação com irrigação controlada.

Durante o florescimento, os vasos foram levados para a sala de pulverização do Laboratório de Tecnologia de Aplicação para os testes, sendo dispostos em duas linhas espaçadas em 45 cm (Fig.1). Este ambiente fechado não sofreu interferência de ventos e as aplicações foram feitas com temperatura de $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 57 ± 4 observadas por meio de um Termo higrômetro digital (modelo SH-122).

Fig. 1. Plantas de soja alocadas na sala de pulverização do Laboratório de Tecnologia de Aplicação.



Fonte: elaborada pela autora

No mesmo dia da colocação dos vasos com plantas de soja na sala de pulverização, foram coletadas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) das entradas de três colmeias, visando obter apenas abelhas campeiras que retornavam do campo. As abelhas foram colocadas em potes plásticos com tampas perfuradas, permitindo a troca gasosa, foram anestesiadas em freezer, e, em seguida, fixadas às plantas com o auxílio de agulhas, transpassando de baixo para cima, primeiramente a estrutura vegetal (folhas e flores) e por último a abelha, pelo tórax. Os insetos foram fixados no estrato superior e intermediário das plantas, visando avaliar o efeito da arquitetura da planta sobre a exposição das abelhas ao fungicida (Fig. 2).

Fig. 2. Abelhas melíferas (e outras) fixadas em folhas de soja com agulhas, antes (antes (esquerda) e após (direita) a pulverização do fungicida. (legenda acima)



Fonte: elaborada pela autora

A pulverização do fungicida Fox[®] Xpro (BAYER, 2019), foi realizada por meio de um simulador de pulverização estacionário equipado com barra de quatro bicos espaçados em 0,5 m, em volume de calda de 144 L.ha⁻¹, na dose de 0,5 L.ha⁻¹ do

produto comercial, conforme recomendado em bula para controle de antracnose (*Colletotrichum truncatum*). Considerando-se que o produto é uma suspensão, a embalagem foi agitada manualmente por três minutos antes da dosagem.

Para avaliar o efeito do tamanho da gota na contaminação das abelhas, foram feitas aplicações com pontas de pulverização que produziram gotas finas (modelo XR110015) e gotas grossas (modelo AIXR110015), em velocidade constante de 4 km.h⁻¹, com pressão de 200 kPa, mantidas a uma altura de 0,50 m em relação ao topo das plantas, para perfeita sobreposição dos jatos, em ambiente fechado.

Após 15 minutos da aplicação do fungicida, foram coletadas amostras com 20 abelhas melíferas, com quatro repetições (2 alturas nas plantas, 2 tipos de gota), totalizando 320 abelhas.

A retirada das abelhas das plantas foi realizada sem contato com os insetos. Para tanto, o tubo de armazenamento foi colocado próximo do local de fixação e, então, a agulha foi puxada para baixo. Dessa forma, as abelhas foram coletadas em tubo Falcon, com volume de 50ml. Após a coleta, os tubos identificados foram guardados em ultrafreezer.

Para a determinação dos três princípios ativos (p. a.) que compõem o fungicida Fox[®] Xpro, foram adquiridos os padrões (Sigma) para a construção de curvas padrão. Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu Prominence-i LC-2050) equipado com uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 2,1x100 mm 3,5µm a uma temperatura de 35°C. O fluxo foi mantido em 0,6 mL min⁻¹ e a detecção foi realizada em um detector UV-Vis em 210 nm. As fases móveis utilizadas foram: (A) Ácido Fosfórico 0,1M e (B) Acetonitrila em modo gradiente (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros do programa do método de análise com a variação percentual das fases móveis A e B durante o tempo de análise.

Tempo (min)	% A	% B
0,00	55	45
7,50	53	47
15,00	40	60
15,01	55	45
20,00	55	45

Foram determinados o tempo de retenção, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) dos três p.a. (Mesquita et al., 2013; Serafim et al., 2021),

observados em relatórios gerados por regressão linear feita pelo software LabSolution (Shimadzu), do sistema HPLC (Tabela 2).

Tabela 2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos princípios ativos (p. a.) que compõem o fungicida comercial Fox Xpro.

p. a.	Tempo de retenção	r^2	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
Protioconazol	4,303	0,9996	0,75	2,26
Bixafen	5,369	0,9996	0,47	1,42
Trifloxistrobina	12,679	0,9989	0,80	2,43

Após a validação dos testes de determinação dos p. a., as amostras com abelhas foram secas a frio, em liofilizador marca LioBras, modelo Liotop K107, por um período de 24 horas. Após a secagem, às amostras foram acrescidas de reagentes para um processo de extração, seguido de *clean-up*, de acordo com um método Quechers modificado (Rahman et al., 2022) (Tabela 3). Dessa forma, foi determinada a concentração dos três p. a. presentes na calda utilizada nos experimentos e que atingiu as abelhas durante as pulverizações.

Tabela 3. Quantidades* (g) de reagentes utilizados nas etapas de extração e *clean-up* das amostras de abelhas melíferas.

Solvente (mL)	Extração (g)				<i>Clean-up</i> (mg)		
	MgSO ₄	NaCl	SCTD	SCDS	MgSO ₄	PSA	C18
Acetonitrila	0,40	0,10	0,10	0,05	37,7	6,3	6,3

*Quantidades utilizadas para cada amostra com 20 abelhas.

Os valores médios de exposição das abelhas, considerando-se cada p. a., foram utilizados para a determinação das doses experimentais utilizadas nos testes de estresse oxidativo.

2.3 Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas

Com o intuito de avaliar se o estágio nutricional pode interferir nas respostas metabólicas inerentes ao estresse oxidativo, foram utilizadas 10 colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.), mantidas em colmeias Langstroth. Para contribuir com o aporte nutricional de metade das colônias, foi fornecida suplementação alimentar com

1000 mL de xarope à base de água e açúcar (sacarose de cana-de-açúcar) na proporção 1:1, divididos em duas vezes por semana. Além da suplementação energética, foi oferecida uma pasta proteica à base de pólen apícola (80%) e mel (20%), obtidos do mesmo apiário de realização do experimento.

O outro grupo de colônias não teve sua alimentação suplementada e, para promover a redução da quantidade de alimento disponível para essas colônias, foi instalado um coletor de pólen no alvado de cada colmeia. A coleta de pólen foi realizada diariamente e as quantidades obtidas foram registradas por semana. O manejo nutricional das 10 colônias foi realizado durante 14 semanas.

Para estimar a eficiência dos coletores de pólen, do grupo com alimentação restrita, um observador contou a entrada de abelhas com pólen em um coletor de pólen, durante 30 minutos, entre 8 e 10h. Em seguida, as bolotas de pólen que caíram na gaveta coletora de pólen foram levadas para o laboratório, onde foram contadas. Este processo foi repetido duas vezes para cada uma das colônias com restrição alimentar. A eficiência dos coletores de pólen foi determinada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência do coletor de pólen (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de bolotas de pólen}}{(2 \times \text{n}^\circ \text{ de abelhas com pólen})} \times 100$$

2.4 Coleta de abelhas das colônias experimentais e contaminação por contato

Após o período de manejo nutricional das colônias, *pools* de abelhas campeiras dos grupos com suplementação e restrição alimentar foram coletados dos alvados das colmeias, os quais foram fechados durante a coleta, visando obter apenas abelhas campeiras. Os insetos foram colocados em potes plásticos com volume de 0,25 L e tampa com furos que permitiam a troca gasosa. No laboratório, os potes foram colocados em freezer por alguns minutos para que as abelhas ficassem anestesiadas.

Em anestesia, 90 abelhas foram tratadas topicamente com uma das duas doses de 1µg ou 7 µg do mesmo p. a. (padrão Sigma) ou com os três p. a. em associação, os p. a. foram dissolvidos em acetona, e cada abelha foi contaminada com 0,5 µL. Em seguida, estas abelhas foram divididas em três potes plásticos, onde permaneceram por 24 horas em estufa com temperatura controlada de 33 °C e umidade relativa do ar 70%, sendo alimentadas *ad libitum* com xarope contendo proporções de 2:1 de sacarose e água.

2.5 Obtenção do homogenato do tórax e dosagem de proteínas

As abelhas foram novamente anestesiadas para que fossem dissecadas. Com auxílio de pinça e tesoura, foram descartados cabeça, abdômen, pernas e asas, aproveitando-se apenas os tórax, conforme descrito por Hoskins et al. (1956). Os tórax foram colocados em almofariz contendo 20 ml do meio de isolamento (250 mM sacarose, 1 mM EGTA e 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2), mantido a 4°C. O macerado foi obtido usando-se um pistilo de porcelana. O homogenato obtido foi filtrado em gaze dobrada por oito vezes. A proteína total do homogenato foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), e albumina de soro bovino como padrão.

2.6 Avaliação do estresse oxidativo

2.6.1 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutationa reduzida (GSH) para glutationa dissulfeto (GSSG), catalisada pela GPx e a consequente oxidação da NADPH pela GSSG (FLOHÉ e GÜNZLER, 1984). O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6) e homogenato de tórax das abelhas (1 mg de proteína/mL). A atividade enzimática foi avaliada a 30°C em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 no comprimento de onda de 340 nm e a oxidação de 1 µmol de NADPH/min foi usada como uma unidade de glutationa peroxidase. A atividade específica será expressa como unidade por mg de proteína/minuto.

2.6.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase foi realizada com o homogenato de tórax de abelhas (1 mg de proteína/mL) em 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7). A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de H₂O₂ 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 µmol de H₂O₂ por minuto, a 25°C e pH 7. A absorvância foi lida em espectrofotômetro

Beckman-Coulter modelo DU-800 a 230 nm. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína/minuto (AEBI, 1974).

2.7 Concentração de oxidantes não enzimáticos

2.7.1 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

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

2.7.2 Determinação da concentração de glutathiona dissulfeto (GSSG)

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

2.7.3 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

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

2.8 Avaliação da lipoperoxidação

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

2.9 Análises estatísticas

Para a análise de exposição aos p. a. que compõem o fungicida comercial estudado, foi utilizando um planejamento fatorial com dois fatores (tamanho da gota e posição das abelhas nas plantas). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando foi observado efeito significativo ($P < 0,05$), foram feitas comparações das médias por meio do teste de Tukey.

Quanto ao pólen obtido por meio dos coletores instalados junto às colônias com restrição alimentar, foi calculada a média semanal de produção de pólen. A eficiência dos coletores de pólen foi avaliada por meio da média de oito observações, em quatro colmeias. Para ambos, a dispersão dos dados foi determinada pelo erro padrão residual.

Para a avaliação do estresse oxidativo, os resultados de cada tratamento (dose do p. a. isolado ou em associação) foram comparados com os resultados obtidos a partir de abelhas do grupo controle, oriundas de colônias que receberam suplementação alimentar. Não houve distribuição normal dos resultados. Sendo assim, foram calculadas as medianas, as quais foram comparadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($P < 0,05$) (SAS Institute, 2020).

3. Resultados

3.1 Quantificação dos p. a. na calda de pulverização e nas abelhas melíferas

Na calda contendo o fungicida Fox[®] Xpro, utilizada para o tratamento de plantas de soja, nas quais foram fixadas as abelhas melíferas, foram observados os p. a. bixafen, protioconazol e trifloxistrobina, em concentração de 0,621 g.L⁻¹, 0,802 g.L⁻¹ e 0,721 g.L⁻¹, respectivamente.

O p. a. bixafen foi detectado e quantificado em amostras de abelhas melíferas fixadas em plantas de soja. Não foi observada diferença significativa da quantidade deste p. a. em função do tamanho da gota e da posição das abelhas nas plantas. A quantidade observada de bixafen variou de 1,05 a 1,13 µg/indivíduo de abelha melífera (Tabela 4).

A presença do princípio ativo protioconazol não foi detectada nas amostras de abelhas melíferas fixadas em planta de soja. O p. a. trifloxistrobina foi detectado e quantificado nas amostras de abelhas melíferas, sem diferença significativa entre abelhas que estavam na parte de cima ou no meio da planta e entre aquelas que foram pulverizadas com gota fina ou grossa. A contaminação observada com este p. a. variou de 6,26 a 7,79 µg/indivíduo de abelha melífera (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade observada de bixafen (Bix), protioconazol (Pro) e trifloxistrobina (Tri) (µg/indivíduo) em abelhas melíferas fixadas em plantas de soja pulverizadas com o fungicida Fox Xpro.

Efeitos		Bix	Pro	Tri
Tamanho da gota	Fina	1,09	-	7,03
	Grossa	1,08	-	7,03
Altura na planta	Topo	1,11	-	7,54
	Meia altura	1,07	-	6,51
	Fina x Topo	1,13	-	7,79
Interação	Grossa x Topo	1,09	-	7,29
	Fina x Meia altura	1,05	-	6,26
	Grossa x Meia altura	1,08	-	6,76
Erro padrão da média		0,02	-	0,78
Fontes de variação		Probabilidade		
Tamanho da gota		>0,200		
Altura na planta		0,114		
Interação		0,135		

Considerando-se os valores observados de exposição das abelhas, foram estabelecidas as doses de 1 e 7 µg.indivíduo⁻¹ de cada p. a. a ser aplicado por contato

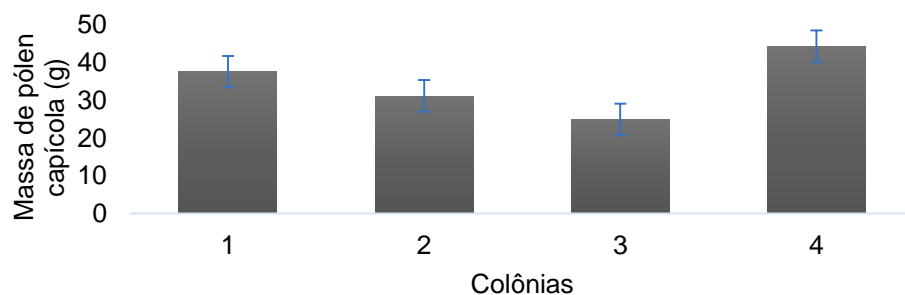
no tórax das abelhas, em 0,5 microlitro de solução de acetona, de forma isolada ou em associação com os demais p. a., utilizando-se uma micro seringa (OECD,1998).

3.2 Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas

As colônias com alimentação suplementada consumiram todo o xarope e toda a pasta proteica fornecidos durante as 14 semanas. No período, cada colônia recebeu 14 L de xarope e 1,4 kg de pasta proteica. No grupo com alimentação restrita, uma colônia definhou. Sendo assim, continuaram a fazer parte da pesquisa oito colônias, sendo metade de cada grupo de manejo alimentar.

No grupo com alimentação restrita, foram obtidos $35,5 \pm 2,3$ g de pólen apícola por semana por colônia, em média (Fig. 3). Durante as 14 semanas, em média, foram coletados 497g de pólen apícola de cada colônia.

Figura 3. Massa de pólen apícola (g), obtida semanalmente em quatro coletores de pólen, instalados em quatro colmeias, durante 14 semanas (média \pm erro padrão da média).



Fonte: elaborada pela autora

Ao registrar a entrada de abelhas com pólen em suas corbículas e depois efetuar os cálculos necessários, observou-se que os coletores apresentaram eficiência média de $59,97 \pm 3,24\%$. Dessa forma, considerando a quantidade média de pólen apícola retida nos coletores, é possível inferir que estas colônias conseguiram fazer uso dentro do ninho de cerca de 21,3 g de pólen apícola por semana.

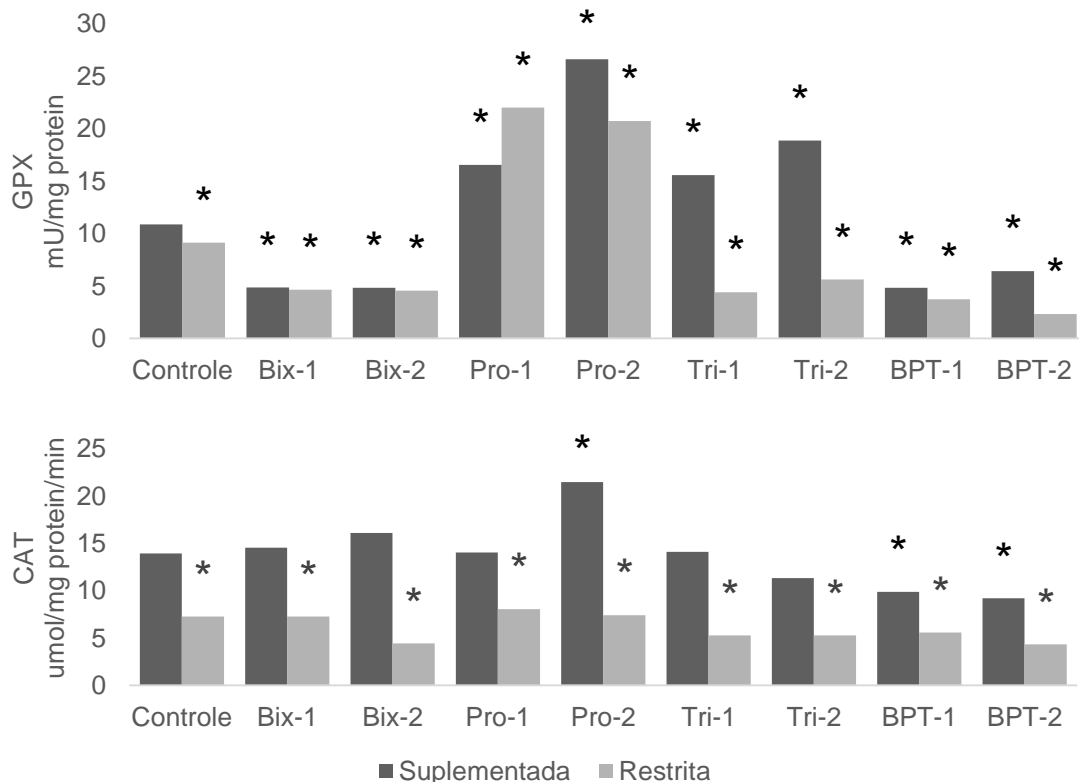
3.3 Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT)

Houve aumento da atividade de GPx quando as abelhas de ambos os grupos

foram expostas por contato a uma das duas doses de protioconazol ou trifloxistrobina, exceto para abelhas oriundas de colônias com alimentação restrita expostas a uma das doses de trifloxistrobina, que tiveram atividade reduzida desta enzima. Com bixafen ou os três p. a. em associação, houve diminuição da atividade de GPx para abelhas dos dois grupos de manejo alimentar (Fig. 4). A atividade de GPx em abelhas não tratadas com os fungicidas foi menor em insetos oriundos de colônias com alimentação restrita em comparação com as abelhas com alimentação suplementada.

A atividade da enzima CAT foi maior com o uso da maior dose de protioconazol em abelhas do grupo com suplementação alimentar. Para abelhas deste grupo de manejo alimentar, os demais tratamentos com um ou três p. a. não alterou a atividade da CAT. Para abelhas oriundas de colônias com restrição alimentar, a atividade da CAT foi menor em relação ao controle em todas as comparações (Fig. 4).

Fig. 4. Atividade de enzimas antioxidantes no homogenato do tórax de abelhas melíferas, 24 horas após a exposição por contato com Bixafen (Bix), Protioconazol (Pro), Trifloxistrobina (Tri) ou os três em associação (BPT), em duas concentrações (1 e 7 μg por indivíduo); abelhas oriundas de colônias que tiveram alimentação suplementada ou restrita. * = diferente do controle com alimentação suplementada.



Fonte: elaborada pela autora

3.4 Ensaio de glutathiona

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi maior quando as abelhas de ambos os grupos de manejo nutricional foram tratadas topicamente com um ou os três p. a., exceto para abelhas do grupo com restrição alimentar tratadas com bixafen (Fig. 5). Não houve diferença da concentração de GSH quando as abelhas não foram tratadas com os fungicidas.

A concentração de glutathiona dissulfeto (GSSG) foi menor em abelhas coletadas de colônias com restrição alimentar e não foi observado efeito dos tratamentos com fungicidas. Quando considerada a razão GSH/GSSG, observa-se um aumento significativo em todas as comparações com o grupo controle de abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar (Fig. 5).

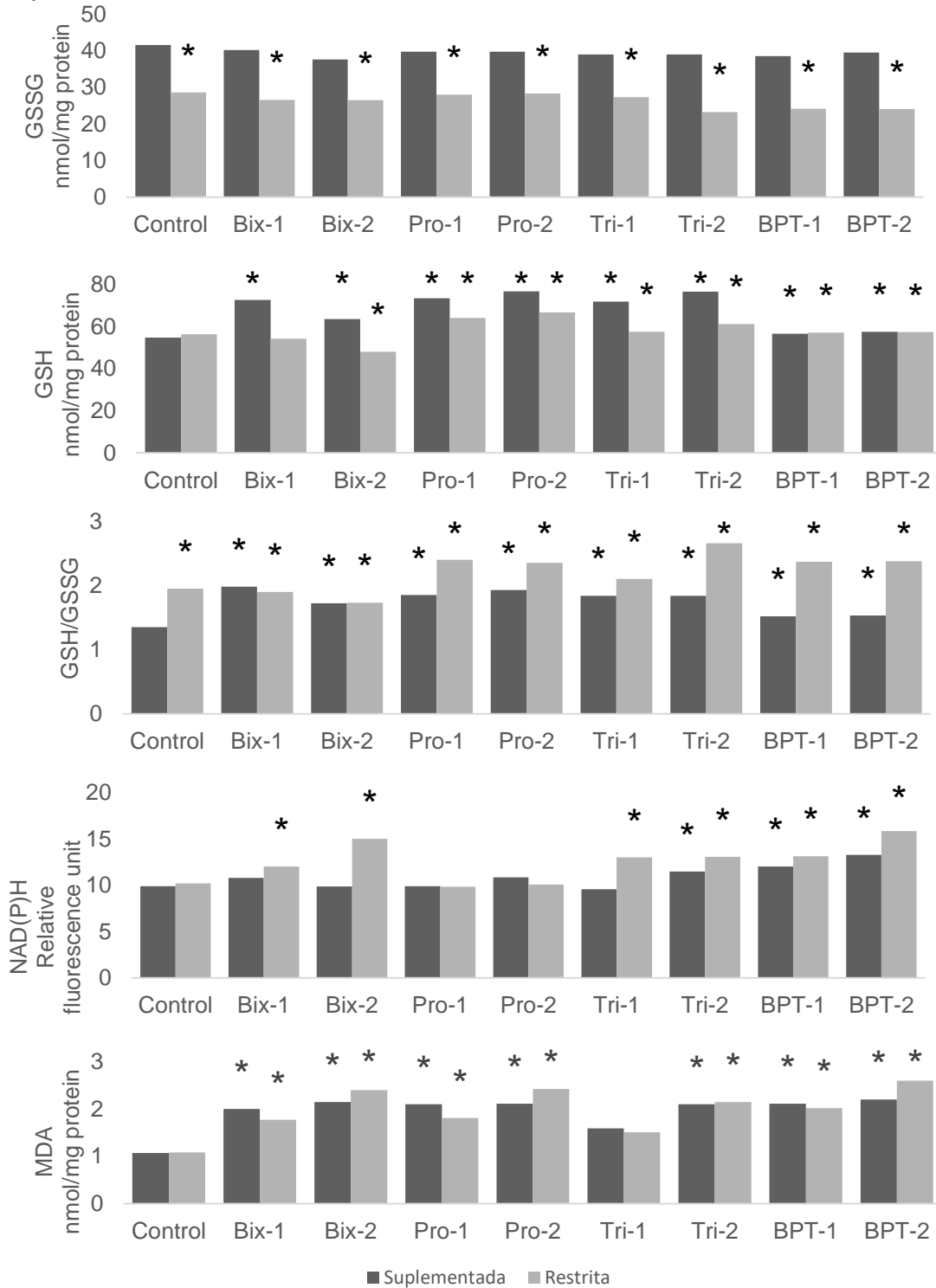
3.5 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A concentração de NAD(P)H foi maior quando as abelhas de colônias com restrição alimentar foram tratadas com bixafen, trifloxistrobina e os três p. a. em associação, tanto para a dose de 1 como de 7 $\mu\text{g}.\text{indivíduo}^{-1}$. Para as abelhas do grupo com suplementação alimentar a concentração de NAD(P)H foi maior quando as abelhas foram tratadas com a maior dose de trifloxistrobina e com a associação dos p. a. em menor ou maior dose (Fig. 5).

3.6 Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação, estimada em função do aumento dos níveis de MDA no homogenato das abelhas, foi observada em todos os tratamentos com fungicidas isolados ou em associação de modo dose-dependente, exceto para as menores doses de trifloxistrobina, de ambos os grupos de manejo alimentar, que não diferiram do controle (Fig. 5).

Fig. 5. Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no homogenato de tórax de abelhasmelíferas, 24 horas após a exposição por contato com Bixafen (Bix), Protioconazol (Pro), Trifloxistrobina (Tri) ou os três em associação (BPT), em duas concentrações (1 e 7 μg por indivíduo); abelhas oriundas de colônias que tiveram alimentação suplementada ou restrita. * = diferente do controle com dieta suplementada.



Fonte: elaborada pela autora.

4. Discussão

4.1 Análise da calda de aplicação e níveis de exposição das abelhas aos p. a.

Na análise química da calda utilizada para aplicação sobre as plantas de soja, nas quais as abelhas melíferas foram fixadas com agulhas, observou-se a presença de 43,0, 31,9 e 38,4% a mais de Bix, Pro e Tri, respectivamente, considerando-se a dose e a diluição utilizadas e a porcentagem indicada pelo fabricante de cada um dos três p. a. no produto comercial. O fungicida Fox[®] Xpro é uma suspensão concentrada (Bayer, 2019), ou seja, uma mistura heterogênea, sem uniformidade na distribuição dos solutos. Dessa forma, desde a embalagem do produto, que em seguida passa pelo tanque de pulverização onde é diluído e depois é aplicado sobre as plantas, pode haver desuniformidade da distribuição dos p. a. na calda de aplicação (Luckham, 1989; Atkins et al., 2016). No presente experimento, o produto comercial foi devidamente agitado antes da dosagem, assim como a calda. Contudo, a distribuição de calda contendo suspensão concentrada, de fato, tende a ser desuniforme (Hazra e Purkait, 2019).

Foi observada distribuição heterogênea dos p. a. em relação às porcentagens de cada um no produto comercial na calda de aplicação. O p. a. Pro. não foi observado nas amostras coletadas de abelhas. Este p. a. tem baixa solubilidade em água (0,3 g L⁻¹ de solução com pH 8,0) (IBAMA, 2019). Mesmo adotando uma diluição recomendada pelo fabricante, a calda apresentava mais que o dobro da quantidade capaz de ser dissolvida em água (0,608g.L⁻¹de Pro.), fato que pode ter contribuído para a não detecção desse p. a. nas amostras de abelhas. O p. a. detectado em maiores quantidades foi Tri., com média de 7,03 µg.indivíduo⁻¹. Tri. é um fungicida muito estável, mesmo após a aplicação (EFSA et al., 2017), fato que pode ter contribuído para a sua detecção em níveis mais altos. O p. a. Bix. foi detectado em todas as amostras de abelhas, com valor médio de 1,09 µg.indivíduo⁻¹.

A falta de homogeneidade da distribuição dos p. a. na calda pode ter influenciado nos resultados relativos aos efeitos tamanho da gota e altura das abelhas nas plantas. Prado et al. (2019), observaram maiores valores de deposição nas folhas da parte superior das plantas de soja (69%), seguidas da parte mediana (22%) e inferior (9%), em pulverizações controladas. Quanto ao tamanho das gotas, embora

não tenha sido observada diferença estatística, a exposição pode ser maior quando se utilizam pontas de aplicação que produzem gotas finas, pois, com o aumento de gotas geradas, aumenta-se a cobertura de pulverização (Guler et al., 2012). Mesmo com a variação inerente aos dados coletados, ressalta-se que tais níveis de exposição foram obtidos a partir de aplicação do fungicida Fox[®] Xpro segundo as recomendações agronômicas, tornando-se este um método a ser considerado para a determinação de doses ambientalmente relevantes para exposição por contato.

4.2 Manejo alimentar das colônias melíferas

Os alimentos ofertados semanalmente para as colônias do grupo com suplementação alimentar foram totalmente consumidos. O xarope contendo sacarose e água em iguais proporções é um alimento rapidamente consumido pelas abelhas e que favorece o crescimento populacional. O suplemento proteico foi elaborado a partir de ingredientes naturais para as abelhas, favorecendo o consumo deste alimento. Embora seja dado destaque ao teor proteico do pólen apícola, há ainda em sua composição lipídios, vitaminas e minerais que favorecem o desenvolvimento das abelhas (Somerville, 2005).

Além dos alimentos ofertados, as colônias do grupo com suplementação alimentar puderam coletar e armazenar todo o pólen coletado. As colônias do grupo com restrição alimentar tiveram cerca de 60% a menos de pólen coletado disponível para a sua manutenção e não foram suplementadas. A redução da quantidade de pólen disponível para as abelhas desse grupo chegou a níveis considerados mínimos para a manutenção de uma colônia (Danner et al., 2017), e pode ter desfavorecido a diversidade proteica deste alimento, prejudicando assim o desenvolvimento das crias (Crailsheim, 1990; Vaudo et al., 2015).

A restrição alimentar na fase larval pode ser compensada por uma boa nutrição na fase adulta (Schilcher et al., 2023), porém, neste trabalho, a restrição alimentar ocorreu por 14 semanas. Se considerados 21 dias de desenvolvimento larval e pelo menos 21 dias de vida adulta, a restrição alimentar das colônias teve início de sete a oito semanas antes da postura dos indivíduos que foram utilizados neste experimento. A restrição proteica durante os primeiros dias de fase adulta pode antecipar o

envelhecimento das abelhas e promover distúrbios metabólicos que tornam estes insetos mais sensíveis a agentes estressores (Martelli et al., 2022).

Quanto ao grupo com dieta suplementada, optou-se por utilizar pólen apícola como ingrediente proteico. A utilização deste alimento natural das abelhas como um suplemento proteico traz o risco de contaminação com agentes patogênicos que podem comprometer a saúde e o desempenho das colônias (Somerville, 2005). Neste experimento, o pólen apícola utilizado foi obtido do apiário onde o experimento foi desenvolvido. Contudo, embora existam suplementos comerciais elaborados sem pólen apícola, há maior consumo do alimento e longevidade das abelhas quando o pólen apícola faz parte da dieta apícola (Lamontagne-Drolet et al., 2019).

4.3 Estresse oxidativo em abelhas expostas aos fungicidas

O estresse oxidativo ocorre quando há desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa celular antioxidante. Para evitar danos às células quando acometidas por xenobióticos, pode haver maior ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Hodgson e Smart, 2001). Para avaliar o efeito no estresse oxidativo, as atividades das enzimas GPx e CAT, o estado oxidativo da GSH e da NAD(P)H, além da peroxidação dos lipídeos de membrana foram medidos em abelhas em diferentes estados nutricionais, expostas ou não aos fungicidas isolados ou combinados. Neste trabalho, observou-se que a suplementação alimentar contribuiu para o aumento da atividade das enzimas GPx e CAT, exceto para GPx, com a menor dose de Pro, em abelhas oriundas de colônias com alimentação restrita. Resultados semelhantes foram observados por Yazlovytska et al. (2023), que avaliaram o estresse oxidativo em abelhas alimentadas com pólen, pão das abelhas e outros alimentos em gaiolas. Embora tenha sido observado o aumento da atividade da CAT, as abelhas com suplementação proteica daquele experimento foram mais longevas que aquelas alimentadas apenas com xarope de sacarose. Desta forma, pode-se presumir que há uma certa tolerância por estes insetos quanto à maior atividade destas enzimas, que não necessariamente indica um prejuízo à saúde.

Quanto aos fungicidas, Pro e Tri isolados implicaram em aumento da atividade da GPx, enquanto Bix e os três p. a. associados resultaram em redução da atividade

desta enzima. Para a CAT, o destaque foi a redução da sua atividade quando as abelhas foram contaminadas com os três p. a. A tendência de aumento da atividade destas enzimas foi observada por pesquisadores que avaliaram o efeito de inseticidas neonicotinoides sobre as abelhas (Balieira et al., 2018; Murawska et al., 2021). Como são xenobióticos, esperava-se maior atividade enzimática em função da exposição das abelhas aos três p. a., o que não aconteceu.

Bix é um fungicida do grupo das carboxamidas, que atua inibindo o complexo II da cadeia respiratória e, conseqüentemente, desfavorecendo a produção de ATP (Oliver e Hewitt, 2014; Frac, 2019). Este fungicida tem sido utilizado há poucos anos na agricultura e seus efeitos sobre as abelhas não são amplamente conhecidos. Há mais estudos sobre os impactos de outro carboxamida, o boscalida, que pode comprometer a longevidade das abelhas (Simon-Delso et al., 2018), diminuir sua capacidade de voo (Liao et al., 2019) e potencializar os efeitos de neonicotinoides quando aplicado em associação com esses inseticidas (Tsvetkov et al., 2017).

Tri é uma estrobilurina que interrompe a produção de energia, atuando no complexo III da cadeia respiratória. É utilizada em várias culturas agrícolas, prevenindo a propagação de fungos que acometem as sementes e folhas (Frac, 2019). Num estudo de contaminantes encontrados em colônias de abelhas melíferas manejadas na Europa, Tri foi detectado em 20% das amostras avaliadas (Murcia-Morales et al., 2023). A aplicação em associação de Tri com tebuconazol em plantas de tomate causou aumento da mortalidade de abelhas mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), implicando em menor visitação das plantas e, conseqüentemente, menor produção de frutos (Silva-Neto et al., 2018). Para outra estrobilurina, a piraclostrobina, o mesmo efeito desencadeado na cadeia respiratória de fungos patogênicos pode ocorrer em abelhas melíferas quando expostas a este fungicida (Nicodemo et al., 2020).

Pro é uma triazolintiona, que atua na inibição de esteróis e é muito utilizado em culturas agrícolas visitadas pelas abelhas, como soja e algodão (Frac, 2019). Embora este p. a. seja encontrado frequentemente em amostras de néctar e pólen consumidos pelas abelhas, poucas pesquisas realizadas sobre o seu efeito em abelhas indicam que não há prejuízos para o desenvolvimento destes insetos, considerando-se os

níveis de exposição aos quais eles têm sido submetidos (Wood et al., 2020; Thompson et al., 2023).

A GSH é um importante componente não enzimático do sistema antioxidante que em função da exposição a xenobióticos pode implicar na transcrição de enzimas de desintoxicação, proliferação celular e apoptose. Ao buscar a inativação de um agente oxidante, há produção de GSSG e depleção de GSH. Se o sistema está íntegro, há a devida recuperação de GSH. Porém, se o sistema está em desequilíbrio, em virtude da presença de agente oxidante em concentração maior que aquela metabolizável, ocorre desbalanço entre o consumo de GSH e produção de GSSG, fato que indica o estresse oxidativo (Jones, 2002). No presente trabalho, foi observado o desbalanço da relação GSH/GSSG em todas as comparações com abelhas do grupo de abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar e que não foram tratadas com fungicidas.

Num estudo feito com seres humanos adolescentes, foi observado que a razão GSH/GSSG e a atividade de GPx foi maior em indivíduos anêmicos ou obesos, considerados como um mecanismo compensatório de defesa redox aumentada em indivíduos sem distúrbios metabólicos evidentes (Alkazemi et al., 2021). Em abelhas, não é possível fazer comparação para o quadro de obesidade, porém, é possível inferir que há semelhança entre anemia e restrição alimentar, manejo alimentar ao qual algumas colônias do presente trabalho foram submetidas.

Os níveis aumentados de NAD(P)H foram observados com maior frequência em abelhas oriundas de colônias com alimentação restrita. Com os três p. a. em associação, a concentração de NAD(P)H foi aumentada a partir da menor dose, para ambos os grupos de abelhas. Contudo, a evidência do estresse oxidativo pode ser confirmada pelo aumento dos níveis de MDA. Espécies reativas de oxigênio podem reagir com ácidos graxos poli-insaturados das membranas lipídicas e assim comprometer o funcionamento das membranas das células, por meio de peroxidação lipídica, observada pelo aumento dos níveis de MDA (Gawel et al. 2004).

Os níveis de MDA, observados em amostras de homogenato do tórax de abelhas, foram maiores quando as abelhas receberam dieta contaminada com o inseticida neonicotinoide imidacloprido. A adição de cafeína ao alimento contaminado com imidacloprido resultou em níveis reduzidos de MDA em comparação ao grupo

tratado apenas com o inseticida, indicando a importância da dieta como fonte de substâncias antioxidantes (Balieira et al., 2018). Ao avaliar o corpo gorduroso de abelhas operárias, Martelli et al (2022) observaram que a privação de alimentação proteica nos sete primeiros dias de vida destes insetos promove aumento dos níveis de MDA neste tecido, desencadeando um processo de envelhecimento precoce das abelhas, que pode resultar em menor longevidade das abelhas. Em nosso trabalho, os níveis de MDA foram aumentados com a exposição a todos os fungicidas, exceto com a menor dose de Tri, sem diferenças na comparação entre abelhas oriundas de colônias com alimentação suplementada ou restrita.

5. Conclusão

A exposição das abelhas campeiras aos p. a. Bix, Pro e Tri, isolados ou em associação, promoveu alteração dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

A suplementação alimentar com xarope de sacarose, mel e pólen apícola não evitou nem reduziu o impacto dos fungicidas sobre o sistema antioxidante das abelhas melíferas campeiras.

Referências

- Aebi HBHU. (1974). **Catalase**. In: BERGMEYER, H. U. (ed). Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press,673-684.
- Alkazemi D; Rahman A; Habra B. (2021). Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. **Scientific Reports**, 4;11(1):3034.
- Atkins P; Jones L; Laverman L. (2016). **Chemical principles**: the quest for insight. New York: W. H. Freeman and Company.
- Balieira KVB; Mazzo M; Bizerra PFV; Guimarães ARJS; Nicodemo D; Mingatto FE. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honeybees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie**, 49:562–572.
- Batista AC; Domingues CEC; Costa MJ; Silva-Zacarin EC. (2020). M. Isastrobilurin fungicide capable of inducing histo pathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honeybees? **Journal of Apicultural Research**; 59: 5 1-10. Disponível em:<<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>>.

Bayer.(2019). **Fox Xpro**: Fungicida. São Paulo (SP): Bayer S.A .Acesso em: 01 Novembro de 2023. Disponível em:<<https://www.agro.bayer.com.br/d/fungicida-bcs-fox-xpro-br>>.

Brodschneider R; Crailsheim K. (2010). Nutrition and health in honeybees. **Apidologie**, 41: 278-294.

Buege JA; Aust SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52: 302-310.

Cain K; And Skilleter DN. (1987). Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press. 217–254.

Carneiro LS; Martínez LC; Gonçalves WG; Santana LM; Serrão JE. (2020). The fungicide iprodionea affects midgut cells of non target worker honey bees *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Sety**, article 109991. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>>.

Castle D; Alkassab AT; Bischoff G; Steffan-Dewenter I; Pistorius J. (2022) High nutritional status promotes vitality of honey bees and mitigates negative effects of pesticides, **Science of The Total Environment**, 806, Part 4, 151280. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151280>>.

Cizelj GI; Oliveira J; BOŽIĆ I; Forno M; Ribeiro V; Narat M. (2016). Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide Bio chemistry and Physiology**, 128:68-75. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.015>>.

Crailsheim K. (1990). The protein balance of the honeybee worker. **Apidologie**, 21: 417-429.

Danner N; Keller A; Hartel S; Steffan-Dewenter I. (2017). Honey bee foraging ecology: season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. **PLoS One**, 12: 8. Disponível em: <<https://doi:10.1371/journal.pone.0183716>>.

Degrandi-Hpffman G; Chen Y; Watkinsdejonge E; Chambers ML; HIDALGO, G. (2015). Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, 108:2518-2528. Disponível em: <<https://www.doi.org/10.1093/jee/tov251>>.

Degrandi-Hpffman G; Corby-Harris V; DeJong EW.et. al. (2017). Honeybee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, 48:340-352. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0478-y>>

Degrandi-Hpffman G; Gage SL; Gorby-harris V; Carroll M; Chambers M; Graham H; Watkins DeJong E; Hidalgo G; Calle S, Azzouz-Olden-F; Meador ; Snyder L; Ziolkowski N. (2018). Connecting the nutrient composition of seasonal pollen with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology**, 109:114–124. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>>.

De Groot GS; Aizen MA; Sáez A; Morales CL. (2021). Large-scale monoculture reduces honey yield: the case of soybean expansion in Argentina. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 306,107203. Disponível em :<<https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107203>>.

European Food Safety Authority (EFSA); Arena M; Auteri D; Barmaz S; Bellisai G; Brancato A et al. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance trifloxystrobin. **EFSA Journal** 15:e4989.

Filipiak M; Kuszewska K; Asselman M; Denisow B; Stawiarz E; Woyciechowski M et al. (2017). Ecological stoichiometry of the honey bee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. **PLoS ONE** 12(8): e0183236. Disponível em :<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183236>>.

Flohé L; Gunzler WA. (1984). Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, 105: 114-121.

Gaweł S; Wardas, M; Niedworok E; Wardas; P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomości Lekarskie Medical Advances**, 57:453–455.

Glavinic U; Tesovnik T; Stevanovic J; Zorc M; Cizelj I; Stanimirovic Z; Narat M. (2019). Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. **PeerJ** 7:e6325 Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.6325>>.

Guler H; Zhu H; Ozkan HE; Ling P. (2012). Characterization of hydraulic nozzles for droplet size and spray coverage. **Atomization Sprays** 22(8):627-645.

Fisher A; Carvalho CU; Oliveira C; Ribeiro B; Oliveira J; Rangel E. (2017). Synergistic effects of almond protective fungicides on the survival of bee foragers (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 110:802-808. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/tox031>>.

FRAC. **Informações sobre triazóis, estrobilurinas e carboxamidas em ferrugem da soja**. 3. (Informativo 01/2019). Disponível em: <<https://www.frac-br.org>>. Acesso em: 07/nov/2023.

Hazra DK; Purkait A. (2019). Role of pesticide formulations for sustainable crop protection and environment management: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 8:686-693.

Hissin PJ; Hilf R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 74: 214-226.

Hodgson E; Smart RC. (2001). Introduction to biochemical toxicology, in: Wiley-Interscience (3 Eds.), **Hoboken**, 309-323.

Holder PJ; Jones A; Tyler CR; Cresswell JE. (2018). Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115 (51) 13033-13038, Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1804934115>>.

Hoskins DD; Cheldelin VH; Newburg RW. (1956). Oxidation enzyme systems of the honey bee, *Apis mellifera* L. **Journal of General Physiology**, 39: 705–713.

IBAMA. (2019). **Protioconazol: perfil ambiental**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/2019-08-16-Ibama-Perfil-Ambiental-Protioconazol.pdf/view>>. Acesso em: 29 out. 2023.

Jones DP. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. **Methods in Enzymology**, 348: 93-112. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48630-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48630-2)>.

Lamontagne-Drolet M; Samson-Robert O; Giovenazzo P; Fournier V. (2019). The impacts of two protein supplements on commercial honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies, **Journal of Apicultural Research**, 58:5, 800-813.

López J; Krainer S; Engert A et al. (2017). Sub lethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. **Scientific Reports** 7, 40853. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep40853>>.

Luckham PF. (1989). The physical stability of suspension concentrates with particular reference to pharmaceutical and pesticide formulations. **Pest Management Science** 25:25-34.

Martelli F; Falcon T; Pinheiro DG; Simões ZLP; Nunes FMF. (2022). Worker bees (*Apis mellifera*) deprived of pollen in the first week of adulthood exhibit signs of premature aging, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 146: 103774. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103774>>.

Mesquita PL; Afonso RJCF; Aquino SF; Leite GS. (2013). Validação de Método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitaria e Ambiental** 18:295–302.

Mele J; Remmen HV; Vijg J; Richardson A. (2006). “Caracterização de camundongos transgênicos que superexpressam tanto cobre-zinco superóxido dismutase quanto catalase,” **Antioxidantes e sinalização redox**, 8:3-4, 628–638.

Murawska A; Migdal P; Roman A. (2021). Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. **Agriculture** 11(7), 648. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/agriculture11070648>>.

Murcia-Morales M; Vejsnæs F; Brodschneider R; Hatjina F; Van der Steen J JM; Oller-Serrano JL; Fernández-Alba AR. (2023). Enhancing the environmental monitoring of pesticide residues through *Apis mellifera* colonies: Honey bees versus passive sampling, **Science of The Total Environment**,884: 163847. Disponível em :<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163847>>.

Neov B; Georgieva A; Shumkova R; Radoslavov G; Hristov P. (2019). Biotic and Abiotic Factors Associated with Colonies Mortalities of Managed Honey Bee (*Apis mellifera*). **Diversity**, 11:237. Disponível em :<<https://doi.org/10.3390/d11120237>>.

Nicodemo D; Mingattol FE; DeJong D; Bizzera PFV; Tavares MA; Bellini W C; Vicente EF; De Carvalho A. (2020). Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 39:1267-1272. Disponível em :<<https://doi.org/10.1002/etc.47192020>>.

Oliver R; Hewitt HG. (2014). **Fungicides in crop protection**. 2.ed. Boston: CABI, p.189.

OECD. (1998). Test No.214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test.**OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 2:2-4**.

Prado EP; Raetano CG; do Amaral Dal Pogetto MHF; de Souza Christovam R; Lopes PRM; Tomaz RS; Ferreira-Filho PJ; Zied DC; Guerreiro JC; de Cerqueira DTR. (2019). Spray volume deposits and fungicide efficacy on soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Experimental Agriculture** 13:1698–1705.

Rahman A; Ali MA; Xavier C; Santos DM; Daam MA; Azevedo EB; Castele JB; Viera EM. (2022). Modified-QuEChERS method for extracting thiamethoxam and imidacloprid from stingless bees: development, application, and green metrics. **Environmental Toxicology Chemistry** 41:2365-2374.

Raij BV; Canterella H; Quaggio JA; Furlani AMC. (1997). Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2 ed. Campinas: **Instituto Agrônomo**. p.285.

SAS Institute. (2020). **SAS® OnDemand**. Version 9.4. SAS Inst Inc, Cary.

Schilcher F; Hilsmann L; Ankenbrand MJ; Krischke M; Mueller MJ; Steffan-Dewenter I; Scheiner R. (2022). Honeybees are buffered against undernourishment during larval stages. **Frontiers in Insect Science**, 2:951317.

Schuhmann A; Schmid AP; Manzors S; Schlte J; Scheiner R. (2022). Interaction of Insecticides and Fungicides in Bees. **Frontiers in Insect Science**, v. 1. Disponível em : <<https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>>.

Seeley TD. (1989). The honey bee colony as a superorganism. **American Scientist**,77:546-553.

Serafim JA; Silveira RF; Vicente EF. (2021). Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index Detectors via High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods** 4:1387–1393.

Silva-Neto CM; Ribeiro ACC; Gomes FL; Neves JG; Melo APC; Calil FN; Nascimento AR; Franceschinelli EV. (2018). Interação entre fungicidas biológicos e químicos e polinizadores de tomate. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, 12: 425–435. Disponível em: <<https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7690>>.

Simon-Delso N; Martin G; Bruneau E; Hautier L. (2018). Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. **Scientific Reports**, 8: 7241.

Somerville D. (2005). **Fat bees skinny bees** - a manual on honey bee nutrition for beekeepers. Australian Government. Rural Industries Research and Development Corporation. p.150.

Steinhauer N; Kulhanek K; Antúnez K; Human H; Chantawannakul P; Chauzat MP; Vanengelsdorp D. (2018). Drivers of colony losses. **Current Opinion in Insect Science**. 26: 142-148. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>>.

Tadei R; Domingues CEC; Malaquias JB; Camilo EV; Malaspina O; Silva-Zacarin ECM. (2019). Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, 9 (1), 3277. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>.

Thebeau JM; Cloet A; Liebe D; Masood F; Kozii IV; Klein CD; Zabrodski, MW; Biganski S; Moshynskyy I; Sobchishin L; Wilson G; Guarna MM; Gerbrandt EM; Ruzzini A; Simko E; Wood SC. (2023). Are fungicides a driver of European foulbrood disease in honey bee colonies pollinating blueberries? **Frontiers in Ecology and Evolution** 11:1073775..

Thompson LJ; Stout JC; Stanley DA. (2023). Contrasting effects of fungicide and herbicide active ingredients and their formulations on bumblebee learning and behaviour. **Journal of Experimental Biology**, 15;226(6):jeb245180.

Tsuruda JM; Chakrabarti P; Sagili RR. (2021). Honey bee nutrition, *Vet Clin Food Anim* 37:519. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.006>>.

Tsvetkov N; Samson-Robert O; Sood K; Patel HS; Malena DA; Gajiwala PH; Maciukiewicz P; Fournier V; Zayed A. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, 356:1395- 1397.

Vaudo AD; Tooker JF; Grozinger CM; Patch HM. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science** 10:133–141.

Wood SC; Mattos IM; Kozii IV; Klein CD; Dvylyuk I; Folkes CDA; Silva RCM; Moshynskyy I; Epp T; Simko E. (2020). Effects of chronic dietary thiamethoxam and prothioconazole exposure on *Apis mellifera* worker adults and brood. **Pest Management Science**, 76: 85-94.

Yazlovytska LS; Karavan VV; Domaciuk M; Panchuk II; Borsuk G; Volkov RA. (2023). Increased survival of honey bees consuming pollen and bee bread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. **Frontiers in Ecology and Evolution**. 11:1098350. Disponível :<[https://doi: 10.3389/fevo.2023.1098350](https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1098350)>.