

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

**EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS À AGROTÓXICOS**

ILORAN DO ROSÁRIO CORRÊA MOREIRA

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

BOTUCATU – SP  
Junho de 2024



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

**EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS À AGROTÓXICOS**

ILORAN DO ROSÁRIO CORRÊA MOREIRA

Orientador: Prof. Assoc. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Co-orientador: Prof. Dr. Samir Moura Kadri

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

BOTUCATU – SP  
Junho de 2024

M838e      Moreira, Iloran do Rosário Corrêa  
Expressão de genes do sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera* expostas à agrotóxicos / Iloran do Rosário Corrêa Moreira. -- Botucatu, 2024  
69 p. : il., tabs.  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu  
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi  
Coorientador: Samir Moura Kadri  
  
1. Apicultura. 2. Expressão gênica. 3. Sistema antioxidante. 4. Agrotóxico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **ILORAN DO ROSÁRIO CORRÊA MOREIRA**, RA nº: ZNP220132, RG nº 52.911.391-0, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 24/06/2024, a dissertação intitulada **EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS À AGROTÓXICOS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Mestrado Acadêmico, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 24 de junho de 2024



Carlos Pazini Junior  
Supervisor da Seção Técnica de  
Pós-Graduação

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Iloran do Rosário Corrêa Moreira, nascida em 02 de outubro de 1997 na cidade de Campinas (São Paulo), é filha de Geldir Maria Corrêa e Celso Moreira. Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, campus de Botucatu (São Paulo) (2020), atualmente é mestranda em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu (São Paulo).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha mãe querida que me inspira todos os dias a continuar, a minha avó Marlene, que me ensinou a ser forte e gentil e dedico também a pequena Iloran, que um dia sonhou em seguir a carreira acadêmica, olha só onde chegamos! Que esta conquista seja, motivo de orgulho não só para nós como para toda minha família!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao universo, e a todos que estiveram envolvidos na minha jornada acadêmica ao longo do meu mestrado em Zootecnia. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no meu crescimento como pesquisador, e é com profunda admiração que expresso minha sincera gratidão. Agradeço aos meus pais, minha mãe Geldir, por todo amor, cuidado, paciência e incentivo durante o desenvolvimento do meu mestrado e ao meu pai Celso, que independentemente de onde esteja, sei que está muito feliz por esta conquista.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Orsi, pela dedicação, ensinamentos, paciência e orientação constante durante o desenvolvimento do mestrado. Ao Dr. Samir Kadri pela coorientação, e ao MSc. Marcus Alvarez pela colaboração nas análises de bioinformática deste estudo. Agradeço aos integrantes do Grupo NECTAR (Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional), incluindo todos os pós-graduandos, funcionários e estagiários, que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento deste estudo. Em especial, agradeço aos amigos Aline Astolfi, Guilherme Souza, Isabella Lippi, Yan Lima, Jaine Scheffer e Laís Feliciano. Agradeço ao Flavio Augusto pelos bolos de cenoura, brigadeiros e cascões, nas nossas tardes de reclamações e fofocas.

Meus agradecimentos se estendem à FMVZ, seus funcionários e ao Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva (FMVZ – UNESP), em especial ao funcionário do setor de apicultura o Arivaldo Inácio (Dinho), por todos os ensinamentos ao longo do mestrado. Agradeço pelo suporte institucional, pela infraestrutura oferecida e pelo ambiente propício à pesquisa e ao aprendizado. Agradeço a todos os professores com os quais tive o privilégio de aprender no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, bem como aos professores que tive aulas em programas externos à FMVZ - UNESP. Agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, CAPES, - Código de Financiamento 001. E posteriormente a bolsa concedida pela FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo – 2023/00572-6. Muito obrigado também a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## **EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS À AGROTÓXICOS**

### **RESUMO GERAL**

A agricultura moderna depende cada vez mais de agrotóxicos para combater pragas que prejudicam a produção agrícola. Prevê-se um aumento significativo no uso desses produtos, o que representa riscos crescentes para organismos não-alvo, como as abelhas. A presente dissertação foi dividida em dois artigos distintos: o primeiro abrange uma revisão sistemática, enquanto o segundo se concentra na análise da expressão gênica do sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera*. Para aprofundar a compreensão desses efeitos, foi realizada uma revisão sistemática das pesquisas existentes sobre os impactos potenciais dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas melíferas. O objetivo desta revisão foi elencar os trabalhos publicados entre os anos de 2020 a 2023, concentrando-se no efeito dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas melíferas, com foco nas enzimas *CAT*, *SOD* e *GST*. De todos os estudos avaliados predominantemente nos experimentos foram utilizadas doses letais deixando de lado as doses subletais que podem vir ser tão prejudiciais quanto doses mais elevadas, sendo os experimentos em quase suas totalidades realizados em laboratório, avaliando principalmente a exposição oral aos agrotóxicos. Mostrando a necessidade de executar pesquisas em campo e com diferentes tipos de exposição, para melhor compreensão dos efeitos dos agrotóxicos nas abelhas. Já a análise da expressão gênica, teve o objetivo de avaliar a toxicidade de diferentes de agrotóxicos no perfil de expressão gênica do sistema antioxidante de abelhas na fase de campeiras, por meio de análise de transcriptoma. Para isso, foram utilizadas abelhas com mais de 21 dias previamente marcadas e expostas, por contato ou ingestão, com a dose letal ( $DL_{50}$ ) e dose subletal ( $DL_{50/100}$ ) dos agrotóxicos, e avaliadas no período de uma e quatro horas de exposição. Dos 38 genes, até o momento descritos, que compõem o sistema antioxidante das abelhas, 18 apresentaram alterações em sua regulação após a exposição aos agrotóxicos utilizados no estudo. As abelhas expostas aos inseticidas (fipronil e imidaclopride) foram as abelhas que mais apresentaram alterações na regulação da expressão gênica, no período de uma e quatro hora de exposição por ingestão, por outro lado a exposição por contato em uma hora não apresentou resultados significativos e em quatro horas apenas dois genes tiveram alteração em seu perfil de expressão. Este fato sugere que os agrotóxicos testados são capazes de promover alterações no sistema antioxidante das abelhas *Apis mellifera*.

Palavras-chave: apicultura; expressão gênica; polinização; sistema antioxidante; transcriptoma.

## **EXPRESSION OF GENES OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN BEEES *Apis mellifera* EXPOSED TO AGROTOXICS**

### **General summary**

Modern agriculture increasingly relies on pesticides to combat pests that damage agricultural production. A significant increase in the use of these products is predicted, posing growing risks to non-target organisms such as bees. This dissertation has been divided into two separate articles: the first covers a systematic review, while the second focuses on gene expression analysis of the antioxidant system in *Apis mellifera* bees. To gain a deeper understanding of these effects, a systematic review of existing research on the potential impacts of pesticides on the antioxidant system of honey bees was carried out. The aim of this review was to list papers published between 2020 and 2023, focusing on the effect of pesticides on the antioxidant system of honey bees, with a focus on the enzymes *CAT*, *SOD* and *GST*. In all the studies evaluated, lethal doses were predominantly used in the experiments, leaving aside sublethal doses which can be just as harmful as higher doses, and almost all the experiments were carried out in the laboratory, evaluating mainly oral exposure to pesticides. This shows the need to carry out research in the field and with different types of exposure, in order to better understand the effects of pesticides on bees. The aim of the gene expression analysis was to evaluate the toxicity of different pesticides on the gene expression profile of the antioxidant system of bees in the brood stage, using transcriptome analysis. To do this, bees over 21 days old were previously marked and exposed, by contact or ingestion, to the lethal dose ( $LD_{50}$ ) and sublethal dose ( $LD_{50/100}$ ) of the pesticides, and evaluated within one and four hours of exposure. Of the 38 genes described so far that make up the antioxidant system of bees, 18 showed changes in their regulation after exposure to the pesticides used in the study. The bees exposed to the insecticides (fipronil and imidacloprid) were the ones that showed the most changes in the regulation of gene expression, in the one- and four-hour periods of exposure by ingestion; on the other hand, exposure by contact in one hour did not show significant results and in four hours only two genes showed changes in their expression profile. This suggests that the pesticides tested are capable of altering the antioxidant system of *Apis mellifera* bees.

**Keywords:** gene expression; pollination; antioxidant system; transcriptome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> O número de estudos que atendem aos critérios de inclusão, distribuídos de acordo com ano de publicação .....                                                                                                                                                                                             | 22 |
| <b>Figura 2.</b> Número de estudos, distribuídos por classe de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ ou associação). Artigos que examinaram a associações dos efeitos de um ou mais agrotóxicos em um único estudo, podendo incluir mais de um inseticida, herbicida ou fungicida, em um mesmo trabalho..... | 24 |
| <b>Figura 3.</b> O número de estudos, distribuídos por grupo químico .....                                                                                                                                                                                                                                                 | 25 |

### CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> <i>FOXO3</i> estimula diretamente a transcrição do gene <i>SOD2</i> (superóxido dismutase dependente de manganês), codificando na matriz mitocondrial. Já a <i>FOXO4</i> e <i>ATXN3</i> , formam um complexo, que estimula diretamente a expressão da <i>SOD2</i> . Acetilação de <i>FOXO4</i> por <i>EP300</i> ( <i>p300</i> ) ou <i>CREBBP</i> ( <i>CBP</i> ) em resposta ao estresse oxidativo não afeta a indução da transcrição do gene <i>SOD2</i> mediada por <i>FOXO4</i> . E a <i>FOXO1</i> regula positivamente a transcrição de <i>SOD2</i> ..... | 53 |
| <b>Figura 2.</b> A transcrição do gene <i>CAT</i> é diretamente estimulada pelo <i>FOXO3</i> e <i>FOXO6</i> que é regulando positivamente pela <i>FOXO1</i> embora a regulação direta pela <i>FOXO1</i> não tenha sido demonstrada.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 53 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Polietismo etário das abelhas operárias. Adaptado de GALLO <i>et al.</i> , 2002..... | 03 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO 2

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Artigos selecionados de acordo com os critérios de inclusão..... | 19 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO 3

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Genes do sistema antioxidante e suas abreviações..... | 48 |
|------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.</b> Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL <sub>50</sub> ) e subletal (DL <sub>50/100</sub> ) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por ingestão pelo período de 1 hora de exposição..... | 51 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.</b> Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas, na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL <sub>50</sub> ) e subletal (DL <sub>50/100</sub> ) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por ingestão pelo período de 4 horas de exposição..... | 52 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 4:</b> Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas, na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL <sub>50</sub> ) e subletal (DL <sub>50/100</sub> ) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por contato pelo período de 4 horas de exposição..... | 52 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                      |                                                                                                                                      |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| µg                   | Micrograma                                                                                                                           |
| ATXN3                | A ataxina-3                                                                                                                          |
| CAT                  | <i>Catalase</i>                                                                                                                      |
| CCS                  | Cooper chaperone for superóxido dismutase                                                                                            |
| Cu/Zn-SOD            | Superóxido dismutase dependente do mineral cobre/zinco                                                                               |
| DL <sub>50</sub>     | Dose letal                                                                                                                           |
| DL <sub>50/100</sub> | Dose subletal                                                                                                                        |
| Down                 | Downregulation                                                                                                                       |
| EP300/<br>CREBBP     | A histona acetiltransferase p300 também conhecida como p300 HAT ou proteína associada a E1A p300 também conhecida como EP300 ou p300 |
| Fe-SOD               | <i>Superóxido dismutase dependente do mineral ferro</i>                                                                              |
| FOXO1                | Forkhead box protein O1                                                                                                              |
| FOXO3                | Forkhead box protein O3                                                                                                              |
| FOXO4                | Forkhead box protein O4                                                                                                              |
| FOXO6                | Forkhead box protein O6                                                                                                              |
| GPx                  | <i>Glutathione peroxidase</i>                                                                                                        |
| Grx1                 | <i>Glutaredoxin-C4</i>                                                                                                               |
| Grx2                 | <i>Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial</i>                                                                                 |
| Grx-like 1           | <i>LOC411159</i>                                                                                                                     |
| GST                  | <i>Glutathione S transferase</i>                                                                                                     |
| GstD1                | <i>Glutathione S-transferase D1</i>                                                                                                  |
| Gstm1                | <i>Microsomal glutathione S-transferase 1</i>                                                                                        |
| Gstm2                | <i>Microsomal glutathione S-transferase 2</i>                                                                                        |
| GstO1/ GstO2         | <i>Pyrimidinodiazepine synthase</i>                                                                                                  |
| GstS1                | <i>Glutathione S-transferase S1</i>                                                                                                  |
| GstS2                | <i>Glutathione S-transferase S2</i>                                                                                                  |
| GstS3                | <i>Glutathione S-transferase S3</i>                                                                                                  |
| GstS4                | <i>Glutathione S-transferase S4</i>                                                                                                  |
| GstT1                | <i>Glutathione S-transferase theta 3</i>                                                                                             |
| Gstu1                | <i>Glutathione S-transferase 1-1</i>                                                                                                 |
| GstZ1                | <i>Probable maleylacetoacetate isomerase 2</i>                                                                                       |
| Gtpx1                | <i>Glutathione peroxidase-like 1</i>                                                                                                 |
| Gtpx2                | <i>Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase</i>                                                                    |

|                               |                                                    |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                             |
| Mg/kg                         | Miligramas/quilo                                   |
| <i>Mn-SOD</i>                 | <i>Superóxido dismutase dependente do mineral</i>  |
| mRNA                          | RNA mensageiro                                     |
| <i>MsrA</i>                   | <i>Methionine sulphoxide reductase A</i>           |
| <i>MsrB</i>                   | Methionine-R-sulphoxide reductase B1               |
| Ni-SOD                        | Superóxido dismutase dependente de níquel          |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Oxigênio                                           |
| PCR                           | Reação em Cadeia da Polimerase                     |
| RNA                           | Ácido ribonucleico                                 |
| ROS                           | Espécies reativa de oxigênio                       |
| <i>Rsod</i>                   | <i>LOC413369</i>                                   |
| <i>SOD</i>                    | <i>Superóxido dismutase</i>                        |
| <i>SOD1</i>                   | <i>Superóxido dismutase 1</i>                      |
| <i>SOD2</i>                   | <i>Superóxido dismutase 2</i>                      |
| <i>SOD3</i>                   | <i>Superóxido dismutase 3</i>                      |
| <i>Tpx1</i>                   | <i>Peroxiredoxin 1</i>                             |
| <i>Tpx3</i>                   | <i>Thioredoxin peroxidase 3</i>                    |
| <i>Tpx4</i>                   | <i>Thioredoxin peroxidase 4</i>                    |
| <i>Tpx6</i>                   | <i>Peroxiredoxin-6</i>                             |
| <i>Trx/Gtx</i>                | <i>Glutaredoxin 3</i>                              |
| <i>Trx-1</i>                  | <i>Thioredoxin mitochondrial</i>                   |
| <i>Trx-2</i>                  | <i>Thioredoxin-2</i>                               |
| <i>Trx-like1</i>              | <i>Thioredoxin-like protein 1</i>                  |
| <i>Trx-like2</i>              | <i>Peroxiredoxin-like family protein</i>           |
| <i>Trx-like3</i>              | <i>Endoplasmatic reticulum resident protein 44</i> |
| <i>Trxr-1</i>                 | <i>Thioredoxin reductase 1</i>                     |
| TRXs                          | Tiorredoxinas                                      |
| UP                            | Upregulation                                       |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>                                                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>                                                                                                     | <b>2</b>  |
| 1. Importância das abelhas <i>Apis mellifera</i> .....                                                                                  | 2         |
| 2. Agrotóxicos e abelhas melíferas.....                                                                                                 | 3         |
| 3. Sistema Antioxidante.....                                                                                                            | 5         |
| 4. Objetivos.....                                                                                                                       | 6         |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                 | <b>6</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>                                                                                                                  | <b>9</b>  |
| <b>O impacto dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas <i>Apis mellifera</i> -uma<br/>revisão sistemática .....</b>            | <b>10</b> |
| <b>Resumo.....</b>                                                                                                                      | <b>11</b> |
| <b>Abstract .....</b>                                                                                                                   | <b>12</b> |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                      | 13        |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                             | 17        |
| 2.1. Métodos para pesquisa bibliográfica .....                                                                                          | 17        |
| 2.2. Critérios de inclusão e exclusão.....                                                                                              | 17        |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                                      | 18        |
| 3.1. Em que ano e localização geográfica ocorreu as investigações existentes? .....                                                     | 22        |
| 3.2. Quais subespécies de abelhas melífera foram mais comumente estudadas e<br>como foi a realizada a exposição aos agrotóxicos?.....   | 22        |
| 3.3. Quais agrotóxicos e associações foram mais estudados, e quais foram as doses<br>e fase de vida das abelhas foi mais estudada?..... | 23        |
| 3.3.1. HERBICIDAS.....                                                                                                                  | 23        |
| 3.3.2. INSETICIDAS.....                                                                                                                 | 23        |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.3. FUNGICIDAS.....                                                                                                                     | 24 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                                          | 25 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                           | 29 |
| CAPÍTULO 3.....                                                                                                                            | 39 |
| Agrotóxicos alteram a expressão de genes do sistema antioxidante de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas na fase de campeiras ..... | 40 |
| RESUMO.....                                                                                                                                | 41 |
| Abstract .....                                                                                                                             | 42 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                         | 43 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                                                | 46 |
| 2.1 Local do experimento e grupos experimentais .....                                                                                      | 46 |
| 2.2. Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq .....                                                                               | 47 |
| 2.3. Processamento dos dados RNA-Seq e análise de diferenças de expressões<br>gênicas .....                                                | 47 |
| 2.4. Genes do sistema antioxidante.....                                                                                                    | 48 |
| 2.5. Correlação entre os genes e rotas gênicas.....                                                                                        | 50 |
| 2.6. Análise Estatística .....                                                                                                             | 50 |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                                         | 50 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                                          | 54 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                           | 57 |
| CAPÍTULO 4 .....                                                                                                                           | 67 |
| IMPLICAÇÕES.....                                                                                                                           | 68 |

# **CAPÍTULO 1**

---

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### Importância das abelhas *Apis mellifera*

A apicultura é responsável pela geração de milhares de empregos de forma direta e indiretamente. Necessita de baixo valor de investimento inicial e de manutenção, além de ter a vantagens de sua adaptabilidade a quase todas as regiões do país, desde que haja oferta de alimento ao longo do ano. Sendo uma atividade vantajosa principalmente para produtores familiares por proporcionar comercialização de diversos produtos apícolas, como mel, própolis, cera, geleia real, pólen e apitoxina (ARRUDA *et al.*, 2011), além de possibilitar comercialização de produtos artesanais como sabonetes, pão de mel, hidratantes, entre outros.

As abelhas *Apis mellifera* são insetos sociais, da tribo Apini, ordem Hymenoptera e família Apidae, vivem em grandes colônias com castas especializadas (RAMOS; CARVALHO, 2007), uma colônia pode chegar até 60 a 80 mil abelhas operárias, de 0 a 400 zangões e uma rainha (BOMFIM *et al.*, 2017). O desenvolvimento dos indivíduos compreende os estágios de ovo (três dias), larva (seis dias) e pupa (varia de acordo com a casta). Em média rainha, zangões e operárias levam 16, 24 e 21 dias para completar seu ciclo respectivamente, do ovo até a emergência do indivíduo completamente formado (PAGE; PENG, 2001).

A função da rainha na colônia é a realização da postura de ovos que darão origem a novos indivíduos, manutenção da coesão e organização da colônia por meio de feromônios (RAMOS; CARVALHO, 2007), podendo viver até cinco anos de idade e se alimentando exclusivamente de geleia real. Os zangões são machos, fruto óvulos não fertilizados, que se desenvolvem por meio de partenogênese arrenótoca, sua principal função na colônia é a fecundar a rainha virgem (princesa), durante o voo nupcial. Os zangões atingem sua maturidade sexual com 12 dias de idade e morrem após o acasalamento (GALO *et al.*, 2002), em média vivem de 80 a 90 dias (ÁLVARES, 2010), podendo ser expulsos da colônia em períodos de escassez de alimento (FREE, 1980).

As operárias realizam todos os trabalhos de manutenção dentro da colônia, incluindo a limpeza, alimentação das crias e da rainha, construção de favos, coleta e processamento de alimentos e a defesa da colônia (Tabela 1). O cumprimento dessas tarefas ocorre de acordo com a maturidade fisiológica das abelhas operárias, sendo que algumas funções estão intrinsicamente relacionadas ao estado funcional de glândulas (CRUZ-LANDIM, 1994).

**TABELA 1:** Polietismo etário das abelhas operárias. Adaptada de GALLO *et al.*, 2002

| <b>Função das abelhas operárias de acordo com a idade fisiológica – Polietismo etário</b> |                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Idade em dias</b>                                                                      | <b>Função</b>                                                                                     |
| 1º ao 3º Faxineiras                                                                       | Trabalham retirando toda e qualquer sujeira de dentro da colônia.                                 |
| 4º ao 12º Nutrizes                                                                        | Responsáveis pela alimentação das larvas, produção de geleia real e alimentar a rainha.           |
| 13º ao 18º Engenheiras                                                                    | Produzem cera e constroem favos.                                                                  |
| 19º ao 20º Guardiães                                                                      | Permanecem na entrada da colmeia, defendendo o território contra qualquer predador.               |
| 21º em diante –<br>Campeiras                                                              | Responsáveis pelo serviço externo a colônia, coleta de recurso como resina, água, pólen e néctar. |

Durante o forrageamento as campeiras, fazem também o trabalho de polinização, sendo as abelhas *Apis mellifera* consideradas polinizadores essenciais para uma ampla gama de culturas agrícolas e é amplamente reconhecida como a espécie mais predominante em todo o mundo (GARIBALDI *et al.*, 2013). Apesar do extenso conhecimento sobre sua domesticação e distribuição global, a importância de *A. mellifera* como polinizador em habitats naturais ainda carece de compreensão (AEBI *et al.*, 2012). A polinização por insetos contribui para o rendimento de 75% das espécies agrícolas globalmente importantes (KLEIN *et al.*, 2007), incluindo inúmeras espécies de plantas selvagens (OLLERTON *et al.*, 2011). Por outro lado, é nesse momento em que as abelhas acabam tornando -se mais susceptíveis agentes externos como os agrotóxicos.

### **Agrotóxicos e abelhas melíferas**

O crescente aumento da população e da economia mundial levou ao aumento progressivo da geração e utilização de produtos químicos na agricultura (SHARMA *et al.*, 2019). Os agrotóxicos são produtos químicos (naturais ou sintéticos) empregados em diversas práticas agrícolas para controle pragas, ervas daninhas e doenças nas plantas. Podendo ser classificados de acordo com sua finalidade como; herbicidas utilizado em ervas daninhas, inseticidas para pragas agrícolas como a mosca branca, fungicidas, nematicidas para controle de nematoides, etc. (SHARMA *et al.*, 2019; WHO, 2020).

De acordo com a Lei Federal brasileira nº 7.802/89, os agrotóxicos ou pesticidas são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989).

Por causa do constante aumento de pragas agrícolas, que causam grandes prejuízos ao rendimento e qualidade das colheitas, isso vem tornando a agricultura moderna cada vez mais dependente da utilização de agrotóxicos (GOTO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020). Estima-se que de até 2050 a utilização de agrotóxicos dobre, aumentando ainda mais os riscos potenciais e os efeitos prejudiciais sobre os organismos não-alvo (ZHAO *et al.*; 2022). Embora o uso racional dos agrotóxicos possa proteger as culturas contra pragas, o uso descontrolado dificulta a polinização e o forrageamento das abelhas e contribui para reduções de suas populações, mesmo quando usados em baixas concentrações (COLIN *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020).

A relação planta-polinizador representam um dos motores mais importantes da biodiversidade na Terra (OLLERTON, 2017); sem os polinizadores não haveria a reprodução de diversas plantas, comprometendo assim a biodiversidade (OLLERTON *et al.*, 2011). Abelhas melíferas fazem parte do grupo de polinizadores mais importante e o papel desempenhado pelas abelhas como polinizadores em ecossistemas naturais e agro ecossistemas está se tornando cada vez mais evidente e reconhecido (OLLERTON *et al.*, 2011; FÖLDESI *et al.*, 2021). As abelhas são responsáveis pela polinização de diversas culturas agrícolas e plantas silvestres (SILLMAN *et al.*; 2021). Porém, durante esse processo as abelhas acabam ficando susceptíveis diversos fatores que podem acabar afetando sua saúde como a exposição aos agrotóxicos.

A contaminação das abelhas por agrotóxicos pode ser dividida em duas formas distintas, a contaminação aguda e a crônica. A contaminação aguda ocorre quando os recursos coletados pelas abelhas contêm concentrações iguais ou superiores a dose letal ( $DL_{50}$ ) (JOHNSON, 2015; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2016). A contaminação crônica ocorre quando as abelhas são expostas a doses subletais (inferiores a  $DL_{50}$ ), e não é observada alta mortalidade e sim diversas alterações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e neurológicas, comprometendo o bem-estar e manutenção das colônias.

A distinção entre contaminação aguda e crônica nas abelhas expõe os efeitos adversos dos agrotóxicos em diferentes níveis. Enquanto a contaminação aguda evidencia os riscos imediatos à vida das abelhas, a contaminação crônica revela impactos mais sutis, porém igualmente preocupantes, que comprometem o funcionamento saudável das colônias. Portanto, compreender e abordar ambas as formas de contaminação se tornam essenciais para proteger a biodiversidade e garantir a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

### **Sistema Antioxidante**

Os organismos aeróbicos desenvolveram uma rede complexa de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para evitar danos oxidativos, causado pela respiração celular e fatores externos como, poluentes e agrotóxicos. O estresse oxidativo é um processo citotóxico que ocorre nas células quando os mecanismos antioxidantes são sobrecarregados por espécies reativas de oxigênio (ROS). Este desequilíbrio não só causa danos a biomoléculas importantes (lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) nas células, mas também tem impacto nas atividades funcionais tanto em vertebrados como em invertebrados (NIKOLENKO; SALTYSKOVA; GAIFULLINA, 2011). A geração de ROS ocorre principalmente nas mitocôndrias nas quais mais de 90% do oxigênio utilizado pela célula é consumido (PEREZ-CAMPO *et al.*, 1998). O estresse oxidativo também é um modulador significativo das estratégias da história de vida (KRAMER *et al.*, 2021), inclusive nas abelhas. Porém, há evidências limitadas de que esta modulação possa mudar após milhares de anos de seleção natural, uma vez que as abelhas melíferas enfrentaram ambientes contaminados, seja por agrotóxicos ou outros poluentes. A diminuição na produção ou neutralização de ROS é realizada pelos antioxidantes, que atuam também contra seus efeitos deletérios no organismo.

O sistema antioxidante dos insetos é composto por enzimas primárias e secundárias, que atuam direta ou indiretamente nas moléculas de ROS (espécies reativas de oxigênio). A primeira linha de defesa contra o ataque das ROS é fornecida por três tipos diferentes de enzimas antioxidantes primárias que atuam diretamente nas ROS: (1) superóxido dismutase (SODs), que reorganizam o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; (2) catalase, que previne a formação de radicais hidroxila livres ao decompor o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água; e (3) peroxidases, que catalisam uma reação análoga na qual o peróxido de hidrogênio é reduzido a água por um redutor que atua como doador de elétrons, normalmente para a tioredoxina reduzida (TRX) ou a glutatona (GSH) (CORONA; ROBINSON, 2006).

Ação dos antioxidantes são de extremo interesse nos insetos sociais, pois podem explicar como os indivíduos que possuem uma alta metabólica ao longo de sua vida prolongada, permanece saudável sem mostrar sinais de senescência, incluindo estresse oxidativo. Neste contexto, em que as abelhas melíferas estão expostas a diversos estressores externos e xenobióticos, a sugestão de que as os agrotóxicos, influenciam no aumento de ROS sob condições de estresse parece ser importante.

## Objetivos

Os objetivos deste trabalho foi avaliar, por meio da análise de transcriptoma, o efeito de agrotóxicos (dose letal e subletal) em abelhas *Apis mellifera* africanizadas, na fase de campeiras, por testes de ingestão e contato.

O presente estudo resultou no capítulo II intitulado – “O impacto dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera* - uma revisão sistemática”, o qual foi submetido ao periódico “Sociobiology”, conforme suas regras de publicação. E no capítulo III intitulado – “Agrotóxicos modulam a expressão de genes do sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras” o qual foi submetido ao periódico “Bulletin of Insectology”, conforme suas regras de publicação.

## REFERÊNCIAS

AEBI, A.; VAISSIÈRE, B.E.; VAN ENGELSDORP, D.; DELAPLANE, K.S.; ROUBIK, D. W.; NEUMANN, P. Back to the future: *Apis* versus non-*Apis* pollination-a response to Ollerton et al. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 27, n.3, p. 142-143, 2012

ÁLVAREZ, F.P.; SERRANO, J.M.F. O sexo no mundo das abelhas. **Vida apícola**, p. 18- 24, 2010.

ARRUDA, J.F. BOTELHO, B.; CARVALHO, T. Diagnóstico da cadeia produtiva da apicultura: um estudo de caso. In: XXXI ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 31., 2011, Belo Horizonte. **Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual: Desafios da Engenharia de Produção na Consolidação do Brasil no Cenário Econômico Mundial**. Belo Horizonte: Enegep, 2011. p. 1-13. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/13123>. Acesso em: 12 out. 2023.

BOMFIM, I.G.A; OLIVEIRA, M.O; FREITAS, B.M. Curso Técnico em Apicultura: Biologia das abelhas. Fundação Universidade Estadual do Ceará - Funece Universidade Estadual do Ceará – UECE MEDIOTEC. 2017.

BRASIL. **Lei 7.802, de 11 de julho de 1989**. Brasília, DF, 1989. Disponível em [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm). Acesso em: 09 mai. 2024.

COLIN, T.; MEIKLE, W.G.; WU, X.; BARRON, A.B. Traces of a neonicotinoid induce precocious foraging and reduce foraging performance in honey bees. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 14, p. 8252-8261, 2019.

CORONA, M.; ROBINSON, G.E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 687-701, 2006.

CRUZ-LANDIM, C. Polimorfismo na ocorrência de glândulas exócrinas nas abelhas (Hymenoptera, Apoidae). **In: Anais do Encontro de Abelhas, 1**, Ribeirão Preto, 118, 1994.

FREE, J.B. A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo: E.P.U, 79 p, 1980.

FÖLDESI, R.; HOWLETT, B.G.; GRASS, I.; BATÁRY, P. Larger pollinators deposit more pollen on stigmas across multiple plant species—a meta-analysis. **Journal of Applied Ecology**, v. 58, n. 4, p. 699-707, 2021.

GALLO, D. Entomologia Agrícola. Piracicaba: Ed. Ceres. 2002.

GARIBALDI, L.A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZEN, M.A.; BOMMARCO, R.; CUNNINGHAM, S. A.; ... KLEIN, A. M. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, v. 339, n. 6127, p.1608-1611, 2013

GOTO, K.; HORIKOSHI, R.; NAKAMURA, S.; MITOMI, M.; OYAMA, K.; HIROSE, T.; SUNAZUKA, T.; ŌMURA, S. Synthesis of pyripyropene derivatives and their pest-control efficacy. **Journal of Pesticide Science**, v. 44, n. 4, p. 255-263, 2019.

JOHNSON, R. Honey Bee Toxicology. **Annual Review Of Entomology**, v.60, n.1, p.415-434, 2015.

KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KRAMER; B. H. NEHRING; V.; BUTTSTEDT; A.; HEINZE; J.; KORB; J.; LIBBRECHT; R.; MEUSEMANN, K.; PAXTON, R.J.; SÉGURET, A.; SCHAUD, F.; BERNADOU; A. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link?. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1823, p. 20190732, 2021.

NIKOLENKO, A.G.; SALTYSKOVA, E.S.; GAIFULLINA, L.R. Molecular mechanisms of antioxidant protective processes in honeybee *Apis mellifera*. **Oxidative Stress In Vertebrates And Invertebrates: Molecular Aspects Of Cell Signaling**, p. 279-293, 2011.

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

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

RAMOS, M.J; CARVALHO, C.N. Estudo Morfológico e Biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, 2007.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of Pesticides on Honey Bees. **Beekeeping And Bee Conservation - Advances In Research**, p. 77-97, 2016.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A.S.; PARIHAL, R.D.; DAR, O.I.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A.K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1-16, 2019.

SHI, J.; YANG, H.; YU, L.; LIAO, C.; LIU, Y.; JIN, M.; YAN, W.; WU, X. B. Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Science of the Total Environment**, v. 738, p. 139924, 2020.

SILLMAN, J.; UUSITALO, V.; TAPANEN, T.; SALONEN, A.; SOUKKA, R.; KAHILUOTO, H. Contribution of honeybees towards the net environmental benefits of food. **Science of The Total Environment**, v. 756, p. 143880, 2021.

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

OLLERTON, J. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. **Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics**, v. 48, p. 353-376, 2017.

WHO - World Health Organization. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019**. World Health Organization, 2020. Disponível em <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240005662>. Acesso em: 09 mai. 2024.

WU, J.; GE, L.; LIU, F.; SONG, Q.; STANLEY, D. Pesticide-induced planthopper population resurgence in rice cropping systems. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 409-429, 2020

ZHAO, H.; LI, G.; CUI, X.; WANG, H.; LIU, Z.; YANG, Y.; XU, B. Review on effects of some insecticides on honey bee health. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105219, 2022.

## CAPÍTULO 2

---

## **O impacto dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera* - uma revisão sistemática**

Iloran do Rosário Corrêa MOREIRA<sup>1</sup>, Guilherme Duarte Figueiredo de SOUZA<sup>1</sup>, Aline ASTOLFI<sup>1</sup>, Isabella Cristina de Castro LIPPI<sup>1</sup>, Jaine da Luz Scheffer<sup>1</sup>, Renato Agostinho ARRUDA<sup>1</sup>, Suellen Matos da SILVA<sup>1</sup>, \*Ricardo de Oliveira ORSI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center of Education, Science and Technology in Rational Beekeeping (NECTAR), College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, São Paulo State University, Botucatu, Brazil - +55 (14) 3880-2946 – \*Corresponding author: Ricardo de Oliveira Orsi, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ - Campus Botucatu Distrito de Rubião Junior s/n Caixa Postal 560, CEP:18618-970, e-mail: ricardo.orsi@unesp.br

## Resumo

A agricultura moderna depende cada vez mais de agrotóxicos para combater pragas que prejudicam a produção agrícola. É previsto aumento significativo no uso desses produtos, o que representa riscos crescentes para organismos não-alvo, como as abelhas. Durante o forrageamento, as abelhas entram em contato direto ou indireto com diferentes agrotóxicos, ao coletar recursos de culturas contaminadas, afetando não só a abelha, mas também toda a colônia, resultando em diversos problemas a curto e longo prazo, como atrasos no desenvolvimento, danos ao sistema antioxidante, além de redução no número de indivíduos da colônia. O sistema antioxidante eficiente é crucial para as abelhas devido à alta taxa metabólica, que resulta na produção de grandes quantidades de radicais livres em condições fisiológicas. As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) e glutathione S-transferase (*GST*) são fundamentais para combater o estresse oxidativo em insetos. Para compreender melhor esses efeitos, adotamos uma abordagem sistemática para revisar as pesquisas existentes sobre os potenciais impactos dos agrotóxicos no sistema antioxidante de abelhas melíferas. Sendo assim, o objetivo desta revisão foi elencar os trabalhos entre os anos de 2020 a 2023, e mostrar os efeitos dos agrotóxicos (inseticidas, herbicidas e fungicidas), sobre o sistema antioxidante das abelhas melíferas, como foco nas enzimas *CAT*, *SOD* e *GST*. Ao todo foram encontrados 19 artigos que atenderam os critérios dessa revisão, dentre os quais aproximadamente 89% dos experimentos foram conduzidos em laboratório e apenas 11% a campo. Todos trabalhos avaliaram a exposição das abelhas aos agrotóxicos por ingestão, evidenciando a deficiência de trabalhos que utilizem o método de exposição por contato, e que conduzam experimentos no campo. Portanto foi possível sugerir uma série de pontos para futuras pesquisas, afim de melhorar a base de conhecimento atual sobre os potenciais efeitos dos agrotóxicos sob as abelhas melíferas.

**Palavras chave:** abelhas, radicais livres, forrageamento, sistema antioxidante.

### Abstract

Modern agriculture increasingly relies on pesticides to combat pests that damage agricultural production. A significant increase in the use of these products is predicted, posing growing risks to non-target organisms such as bees. During foraging, bees come into direct or indirect contact with different pesticides when collecting resources such as pollen and nectar from contaminated crops, affecting not only the bee, but also the entire colony, resulting in various short- and long-term problems, such as delays in development, damage to the antioxidant and immune systems, as well as a reduction in the number of individuals in the colony. An efficient antioxidant system is crucial for bees due to their high metabolic rate, which results in the production of large amounts of free radicals under physiological conditions. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) and glutathione S-transferase (*GST*) are essential for combating oxidative stress in insects. To better understand these effects, we adopted a systematic approach to review existing research on the potential impacts of pesticides on the antioxidant system of honey bees. Therefore, the aim of this review was to list the works between 2020 and 2023, and show the effects of pesticides (insecticides, herbicides and fungicides) on the antioxidant system of honey bees, focusing on the enzymes *CAT*, *SOD* and *GST*. A total of 19 articles were found that met the criteria of this review, of which approximately 89% of the experiments were conducted in the laboratory and only 11% in the field. All of the studies assessed the exposure of bees to pesticides through ingestion, highlighting the lack of studies using the contact exposure method and conducting experiments in the field. It was therefore possible to suggest a number of points for future research in order to improve the current knowledge base on the potential effects of pesticides on honey bees.

**Keywords:** antioxidant system, bees, free radicals, foraging.

## INTRODUÇÃO

A agricultura moderna depende cada vez mais do uso de agrotóxicos, por causa do aumento constante de pragas no campo que afetam o rendimento e qualidade das colheitas (TODD *et al.*; 2020; WU *et al.*, 2020). Estima-se que nos próximos anos, ocorra aumento significativo na utilização de agrotóxicos aumentando os riscos e impactos negativos em organismos não-alvo, como as abelhas (ZHAO *et al.*, 2022).

Durante o forrageamento as abelhas podem entrar em contato com diversos agrotóxicos, de forma direta e indireta por meio da coleta de recursos como pólen e néctar, em diversas culturas as quais podem conter agrotóxicos, levando à contaminação por contato e/ou ingestão (LUNDIN *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2018; FAVARO *et al.*, 2019). O recurso contaminado pode ser levado para a colônia, promovendo a contaminação de todos os indivíduos (JOHNSON, 2015) causando uma série de problemas a curto e longo prazo, como atraso no desenvolvimento, comprometimento do sistema imunológico e antioxidante, e redução do número de indivíduos da colônia (AL-DALAEN; AL-QTAITAT, 2014; FEAZEL-ORR *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2021).

Os agrotóxicos são agentes biológicos ou substâncias sintetizadas usadas para matar ou restringir o desenvolvimento de organismos (LESKA *et al.*, 2021). Os herbicidas são os agrotóxicos mais utilizados em todo o mundo, seguidos pelos inseticidas e fungicidas (BARBOZA *et al.*, 2018). Os herbicidas são amplamente utilizados no controle de ervas daninhas para aumentar a qualidade e o rendimento das culturas (GIGLIO; VOMMARO, 2022), no entanto, causam efeitos diretos e indiretos em organismos não-alvo (SHARMA *et al.*; 2018; THANOMSIT *et al.*, 2020).

Estudos mostram que os herbicidas causam diversos efeitos fisiológicos e comportamentais em organismos de diferentes espécies que desempenham papéis ecológicos importantes no agro ecossistemas (FREEMARK; BOUTIN, 1995; GUNSTONE *et al.*, 2021), como os nematoides (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2015), minhocas (STELLIN *et al.*, 2018), colêmbolos e isópodes (NIEMEYER *et al.*, 2018), aranhas (MICHALKOVÁ; PEKÁR, 2009; KORENKO *et al.*, 2016), insetos (PROSSER *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2018) e abelhas (ALMASRI *et al.*, 2020).

Já os inseticidas são utilizados para controlar pragas, mas podem afetar muitos organismos não-alvo, como polinizadores em especial as abelhas *A. mellifera*. As mortes de

colônias de abelhas causadas por inseticidas têm sido frequentemente relatadas nas últimas décadas (GOULSON *et al.*, 2015; ZAO *et al.*, 2020). Isso se deve ao crescente entendimento dos efeitos prejudiciais desses produtos sobre as abelhas e outros organismos não-alvo (COLIN *et al.*, 2019).

Os tipos de inseticidas utilizados variam entre as culturas, mas diversos estudos mostram que o uso de inseticidas exerce efeito negativo na saúde das abelhas (DULIN *et al.*, 2014; TOSI; BURGIO; NIEH, 2017; LI *et al.*, 2019; NAIARA GOMES *et al.*, 2020), como inibição da vitelogenina (CHRISTEN; FENT, 2017), danos os lobos ópticos, redução do número de sinapses entre os olhos compostos e os lobos ópticos (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; FISHER *et al.*, 2014), alteração da temperatura dos músculos de voo (HENRY *et al.*, 2015; TOSI *et al.*, 2017), além de reprimir a respostas quimiossensoriais, imunidade e expressão gênica relacionada à desintoxicação (TAN *et al.*, 2015; CHRISTEN *et al.*, 2016), desorientação, problemas de aprendizado, locomoção, capacidade de voo e desenvolvimento muscular (ZHAO *et al.*, 2022). Além dos neonicotinóides, as abelhas estão expostas a uma gama de outros inseticidas como piretróides, clorantraniliprole, espinosade, flupiradifurona e sulfoxaflor (MAIN *et al.*, 2020). Outros agrotóxicos que também podem afetar as abelhas são os acaricidas, utilizados pelo apicultor para controlar o ectoparasita *Varroa destructor* (BONCRISTIANI *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2013; GASHOUT *et al.*, 2020).

Além dos inseticidas, outros produtos químicos como os acaricidas, e os fungicidas, frequentemente incorporados nos tratamentos de sementes (revestimento) e possuem propriedades sistêmica, também podem representar riscos para as abelhas (ZUBROD *et al.*, 2019), logo, são altamente solúveis em água e podem ser absorvidos pelas plantas e translocados pelos caules, folhas, pólen, néctar e água de gutação durante o crescimento das plantas (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2016). Além disso os resíduos da aplicação do fungicida nas sementes também podem ser transportados pelo ar durante o plantio, por exemplo, por meio da abrasão mecânica do revestimento da semente à medida que a semente passa pelo maquinário da plantadeira, expondo as abelhas a partículas de poeira por contato cuticular ou inalação (KRUPKE *et al.*, 2012; BOYLE *et al.*, 2019). Os fungicidas aplicados às sementes podem persistir em baixas concentrações nos tecidos vegetais durante vários meses (NETTLES *et al.*, 2016) e no solo (LEWIS *et al.*, 2016), podendo resultar na contaminação de pólen e néctar das flores que estavam abertas durante a aplicação do fungicida (RONDEAU; RAINE, 2022). O contato das abelhas com os fungicidas pode desencadear uma série de efeitos que incluindo, aumento da mortalidade de crias (larvas) e abelhas adultas (DOMINGUES *et al.*, 2017;

FISHER *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2018), desorientação (ARTZ; PITTS-SINGER, 2015), e redução da viabilidade espermática em zangões de abelhas melíferas (FISHER; RANGEL, 2018). Além disso quando o fungicida é combinado com outros produtos, pode ter efeitos sinérgicos, aumentando assim sua toxicidade para as abelhas, podendo aumentar a suscetibilidade de abelhas melíferas a patógenos (ZALUSKI *et al.*, 2017; RONDEAU; RAINE, 2022).

As doses mais comuns utilizadas em estudos são as doses ambientalmente relevantes, doses letais (DL<sub>50</sub>), e as doses subletais. A dose ambientalmente relevante é determinada por uma média das doses encontradas em campo, podendo estar no pólen, cera, abelhas, água e outros recursos. Essa dosagem pode causar prejuízos às abelhas, como alteração na regulação de genes do sistema digestivo (ASTOLFI *et al.*, 2022).

A DL<sub>50</sub> ou DL<sub>25</sub> (dose letal) causa a morte de até 50% ou 25% de uma população, sendo uma dose mais elevada quando comparada, as doses subletais dos agrotóxicos. Estes acabam entrando nos habitats entorno das terras agrícolas por meio de deriva, escoamento e/ou volatilização, afetando diretamente as fases vegetativas e reprodutivas das plantas nativas. Isso resulta em mudanças estruturais das comunidades e redução na riqueza e abundância de espécies (FLORENCIA *et al.*, 2017; GIGLIO; VOMMARO, 2022), afetando a dinâmica ecológica das espécies associadas às culturas (consumidores primários e secundários, decompositores) (PROSSER *et al.*, 2016; KRAUS; STOUT, 2019), envolvendo espécies que fornecem serviços ecossistêmicos (PLEASANTS; OBERHAUSER, 2013), como polinização (RUSSO *et al.*, 2020). Nas abelhas, é possível observar efeitos prejudiciais dessa dosagem relacionados à saúde, ao forrageamento, à expressão gênica, à diferenciação de castas, ao ganho de peso, ao crescimento das colônias e à função reprodutiva (BERNAUER; GAINES-DAY; STEFFAN, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016; CHMIEL *et al.*, 2020).

A exposição das abelhas a agrotóxicos induz ao estresse oxidativo, aumentando a presença de radicais livres em seus organismos. Tais danos causados por poluentes exógenos são combatidos pelo sistema antioxidante e de desintoxicação dos insetos (JIANG *et al.*, 2020). O estresse oxidativo ocorre quando radicais de oxigênio são produzidos em excesso nas células, excedendo a capacidade antioxidante normal do organismo. Isso é caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que promove o comprometimento simultâneo de seus sistemas de eliminação (OLGUN *et al.*, 2020). O aumento da concentração de ROS pode causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo

assim as funções das células, órgãos ou até mesmo de todo o organismo, podendo levar à morte (KODRÍK *et al.*, 2015). As ROS podem ser classificadas em dois grupos: radicais livres e não radicais. Radicais livres surgem quando moléculas possuem elétrons desemparelhados, tornando-as reativas na busca por estabilidade. Em contrapartida, formas não radicais são geradas quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados (KODRÍK *et al.*, 2015). A principal fonte de ROS, são as mitocôndrias (cadeia respiratória e desaminação de aminas biogênicas), a oxidação microssomal de xenobióticos e a fagocitose (SAGONA *et al.*, 2021).

Nos insetos, dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), e a glutathione S-transferase (*GST*), têm papel importante no combate do estresse oxidativo. Um sistema antioxidante eficiente é de particular importância para insetos cuja alta taxa metabólica contribui para a produção de grandes quantidades de radicais livres sob condições fisiológicas (CANDY *et al.*, 1997; TAWFIK *et al.*, 2020).

As enzimas *SOD* e *CAT* podem remover o excesso de radical livre de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e peróxido de hidrogênio em insetos, para manter o equilíbrio oxidativo (CHEN *et al.*, 2021). A *SOD* é uma metaloenzima que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Nas abelhas, foram descritos três tipos de *SOD*, sendo a primeira: cobre citosólico, superóxido dismutase de zinco (*SOD1* ou *CuZnSOD*); a segunda *MnSOD*, atua como um eliminador de metabólitos ROS dentro da matriz mitocondrial; e a terceira *Cu/ZnSOD* extracelular (*SOD3*) (CORONA; ROBINSON, 2006; NIKOLIĆ *et al.*, 2016; SAGONA *et al.*, 2021).

Enquanto a *CAT*, uma proteína citoplasmática (CORONA; ROBINSON, 2006), que converte eficientemente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A *GST* é uma enzima crucial para a desintoxicação e o sistema antioxidante das abelhas, funcionando em conjunto com a glutathione peroxidase para metabolizar toxinas e manter a homeostase fisiológica (ZOU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020; SAGONA *et al.*, 2021). A *SOD*, *CAT* e a *GST* desempenham papéis essenciais na manutenção da saúde e da função celular nas abelhas melíferas.

Neste estudo o intuito foi fornecer uma visão geral dos efeitos toxicológicos conhecidos dos agrotóxicos, no sistema antioxidante de abelhas melíferas, fornecendo perspectivas futuras para uma avaliação mais precisa da toxicidade e risco dos agrotóxicos para as abelhas melíferas. Para isso foi realizada uma revisão sistemática da literatura para fornecer informações dos efeitos das doses letal, subletal, ambientalmente relevante e/ou associação de uma ampla gama

de agrotóxicos utilizados e que afetam o sistema antioxidante das abelhas. Especificamente, pretendemos responder às seguintes questões:

1. Em que ano e localização geográfica ocorreu a investigação existente?
2. Qual subespécies de abelha melífera foi mais comumente estudada e como foi realizada a exposição aos agrotóxicos?
3. Quais agrotóxicos e associações foram mais estudados, e quais foram as doses e fase de vida das abelhas foi mais estudada?

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Métodos para pesquisa bibliográfica**

A busca de artigos científicos baseou-se nos métodos propostos pelas diretrizes do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (CLARKE *et al.*, 2011; GALVÃO; PANSANI; HARRAD, 2015). A escolha das palavras-chave foi realizada após a leitura de publicações relacionadas ao assunto de interesses, sendo selecionadas: *Apis mellifera*, antioxidant system, pesticides, lethal dose, sublethal dose e stingless bees.

As palavras foram redigidas em inglês para otimizar os resultados da pesquisa. Os operadores booleanos (and, or e not) foram utilizados para tornar a busca mais específica. As palavras-chave juntamente com os operadores booleanos foram inseridas na barra de pesquisa da seguinte maneira: "*Apis mellifera* AND antioxidant system AND pesticides AND lethal dose OR sublethal dose NOT stingless bees".

### **CrITÉRIOS de inclusão e exclusão**

Foram incluídos estudos experimentais que abordavam os efeitos causados por herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ou associações, nas enzimas *CAT*, *SOD* e *GST* do sistema antioxidante de abelhas melíferas. Foram incluídos apenas artigos publicados no idioma inglês. Foram excluídas pesquisas que abordassem abelhas nativas, revisões, meta-análises, artigos em outros idiomas e artigos publicados antes de 2020, sendo selecionados apenas artigos publicados entre os anos de 2020-2023 (IWASAKI; HOGENDOORN, 2021). Todos artigos incluídos foram retirados de periódicos revisados por pares, e a consulta final nas bases de dados foi realizada em 17 de outubro de 2023.

Após a seleção dos artigos, foi realizada a leitura na íntegra do conteúdo, para verificar se o mesmo estava alinhado com o propósito inicial do estudo. Após a leitura, as principais informações dos artigos foram tabeladas. Não foram consideradas restrições quanto à utilização dos agrotóxicos nos estudos selecionados.

## RESULTADOS

Utilizando as palavras chaves selecionadas (*Apis mellifera* AND antioxidant system AND pesticides AND lethal dose OR sublethal dose NOT stingless bees), a primeira pesquisa, resultou em um conjunto de dados primário de 306 publicações. Para garantir a consistência da pesquisa incluída em nossa revisão, optamos por usar apenas artigos de periódicos revisados por pares, que relatassem pesquisas primárias e, portanto, os artigos não revisados por pares foram removidos do conjunto de dados. Artigos que tiveram como alvo abelhas nativas, revisões sistemáticas, ou que não abordassem os genes *SOD*, *CAT* e *GST* sendo todos ou pelo menos um dos genes foram removidos, resultando em 27 artigos restantes. Estes foram então examinados para determinar se os critérios da presente revisão foram atendidos, ou seja, se o artigo investigou os efeitos diretos no sistema antioxidante da abelha de pelo menos um herbicida, inseticida, fungicida e/ou associação em qualquer subespécie do gênero *Apis*, resultando no conjunto final de 19 artigos, os quais tiveram todos os dados tabelados.

Para cada artigo, foram extraídas as seguintes informações: referência bibliográfica completa, país, subespécie do gênero *Apis*, método de exposição (contato ou ingestão), agrotóxico utilizado, dosagem (letal, subletal ou ambientalmente relevante), ano de publicação, país, se os autores realizaram o experimento a campo ou laboratório, e genes avaliados (TABELA 1).

1 **TABELA 1:** Artigos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e as respectivas dosagens dos agrotóxicos analisados.

| Artigo                       | País    | Exp.  |      | Agrotóxico – mg/kg                                         | Produto   |      | Exposição |      | Genes |     |     |
|------------------------------|---------|-------|------|------------------------------------------------------------|-----------|------|-----------|------|-------|-----|-----|
|                              |         | Campo | Lab. |                                                            | Comercial | Puro | Cont.     | Ing. | SOD   | CAT | GST |
| Zaluski <i>et al.</i> , 2020 | Brasil  | X     |      | Fipronil – 0,03<br>Piraclostrobina – 0,85                  | X         |      |           | X    | X     |     | X   |
| Li <i>et al.</i> , 2021      | China   |       | X    | Isoclast: 50%<br>Sulfoxaflor – 1,72                        | X         |      |           | X    | X     | X   | X   |
| Orčić <i>et al.</i> , 2022   | Sérvia  |       | X    | Tiaclopride – 1,79<br>Clotianidina – 0,37                  | N/A       |      |           | X    | X     | X   | X   |
| Gao <i>et al.</i> , 2022     | China   |       | X    | Acetamipride – 2,00<br>Carbaril – 5,00                     |           | X    |           | X    | X     | X   | X   |
| Wu <i>et al.</i> , 2022      | China   | X     |      | Fluvalinato – 18,50*                                       |           | X    |           | X    | X     |     | X   |
| Pons <i>et al.</i> , 2023    | Espanha |       | X    | Glifosato – 7,50                                           |           | X    |           | X    | X     | X   | X   |
| Cang <i>et al.</i> , 2023    | China   |       | X    | Tetraclorantraniliprol –<br>195,55<br>Tebuconazol – 288,42 |           | X    |           | X    | X     | X   | X   |

|                               |          |   |                                                                                              |     |   |   |   |
|-------------------------------|----------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|---|---|
| Decio <i>et al.</i> , 2021    | Brasil   | X | Tiametoxam – 0,02                                                                            | X   | X | X | X |
| Pal <i>et al.</i> , 2022      | França   | X | Imidaclopride – 0,37<br>Difenoconazol - 0,37<br>Glifosato – 0,37                             | X   | X | X | X |
| Almasri <i>et al.</i> , 2020  | França   | X | Imidaclopride – 3,01<br>Difenoconazol – 3,01<br>Glifosato – 3,01                             | X   | X |   | X |
| Bartling <i>et al.</i> , 2021 | Alemanha | X | Tiaclopride – 129,00<br>Fludioxonil – 0,36<br>Dimoxistrobina – 0,09<br>Pendimentalina – 0,05 | N/A | X |   | X |
| Li <i>et al.</i> , 2022       | China    | X | Imidaclopride - 0,04                                                                         | X   | X | X | X |
| Whang <i>et al.</i> , 2023    | China    | X | Tiametoxam – 0,26<br>Triazol flusiolazol – 411,00                                            | X   | X | X | X |

|                                    |         |   |   |                                     |     |   |   |   |   |
|------------------------------------|---------|---|---|-------------------------------------|-----|---|---|---|---|
| Tau-Fluvalinato – 0,27             |         |   |   |                                     |     |   |   |   |   |
| Benito-Murcia <i>et al.</i> , 2022 | Espanha |   | X | Coumafós – 0,59<br>Dimetoato – 0,01 | N/A |   | X | X | X |
| Imidaclopride – 0,05               |         |   |   |                                     |     |   |   |   |   |
| Parkinson <i>et al.</i> , 2022     | EUA     |   | X | Sulfoxaflor – 0,05                  | N/A |   | X | X | X |
| Paleolog <i>et al.</i> , 2021      | Polónia | X | X | Imidaclopride – 0,04                | N/A |   | X | X | X |
| Qi <i>et al.</i> , 2020            | China   |   | X | Flumetrina – 0,37                   |     | X | X | X |   |
| Araújo <i>et al.</i> , 2023        | Brasil  |   | X | Espinosade – 18,13                  | N/A |   | X | X | X |
| Ibrahim <i>et al.</i> , 2023       | Egito   |   | X | Sulfoxaflor – 1204,00               | N/A |   | X |   | X |

- 1 Exp.= Experimento; Lab.= Laboratório; Cont.= Contato; Ing.= Ingestão; SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase) e GST (glutathione S-transferase). \*Para estudos com
- 2 mais de uma dosagem de um mesmo agrotóxico, foi calculada a dosagem média utilizada.

### Em que ano e localização geográfica ocorreu a investigação existente?

Todos os artigos selecionados foram publicados entre os anos de 2020-2023, tendo sido o ano de 2022 com maior número de artigos selecionados seguido dos anos 2023, 2021 e 2020 (sete, cinco, quatro e três respectivamente), (Figura 1). A maioria dos estudos foi realizada na China (sete estudos) e no Brasil (três estudos), seguida pela Espanha e França (dois estudos cada), e Sérvia, Alemanha, Polónia, Egito e Estados Unidos (um estudo cada).

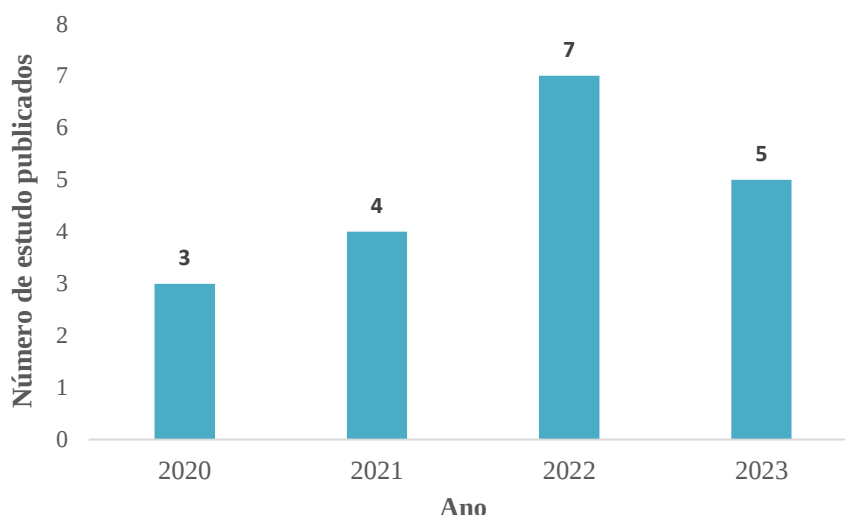


FIGURA 1: Número de estudos que atenderam aos critérios de inclusão, distribuídos de acordo com ano de publicação.

### Quais subespécies de abelha melífera foi mais comumente estudada e como foi realizada a exposição aos agrotóxicos?

A maioria dos estudos não mencionaram a subespécie de abelha utilizada, citando apenas que utilizou abelhas *Apis mellifera* (17 estudos); nos outros estudos foi utilizado abelhas *Apis mellifera carnica* (dois estudos). Todos os estudos utilizaram método de exposição similar para as abelhas, sendo realizada através do fornecimento de alimento contaminado ou não, e nenhum dos estudos selecionados, avaliaram a contaminação por contato. Após o desafio com agrotóxicos, 73,68% dos autores optaram por fazer suas análises com a cabeça ou o corpo inteiro da abelha e apenas 26,32% utilizaram o abdômen. Aproximadamente 89% dos estudos foram conduzidos em laboratório, enquanto apenas 11% foi em campo. A dose letal (DL<sub>50</sub>) foi utilizada na maioria artigos selecionados (nove estudos), seguido pela dose ambientalmente relevante (sete estudos) e a dose subletal (três estudos).

### **Quais agrotóxicos e associações foram mais estudados, e quais foram as doses e fase de vida das abelhas foi mais estudada?**

Dos agrotóxicos investigados 18 estudos avaliaram os efeitos dos inseticidas, seguido dos fungicidas (seis estudos) e herbicidas (quatro estudos) (Figura 2), sendo que alguns artigos avaliaram o efeito de um ou mais agrotóxicos no mesmo trabalho. Os efeitos foram medidos como resultado da exposição a compostos individuais ou a diferentes combinação de agrotóxicos. A maioria dos estudos analisou os efeitos dos agrotóxicos em abelhas adultas (16 estudos), enquanto dois focaram na fase larval, e um estudo avaliou o desenvolvimento da abelha de larva até o vigésimo dia de idade. Não foi identificado nenhum estudo envolvendo abelhas em estágio de pupa ou ovo.

Dos 19 artigos revisados, seis utilizaram múltiplos agrotóxicos, incluindo herbicidas, inseticidas e fungicidas, ou combinações destes, para investigar seus efeitos no sistema antioxidante das abelhas. Geralmente nos estudos que envolveram fungicidas, observa-se que, em média, as doses desses produtos são mais elevadas em comparação com os inseticidas e herbicidas. Em apenas sete estudos não foram observados efeitos significativos na regulação de algum dos genes avaliados, e para os demais estudos houve alteração na regulação dos genes investigados.

#### **HERBICIDAS**

Os principais grupos químicos de herbicidas abordados nos estudos foram as bipiridílias (três estudos), seguidas pelas dinitroanilinas (um estudo) (Figura 3). O glifosato foi o herbicida mais frequentemente estudado, analisado em três estudos, seguido pela pendimetalina em um estudo. Metade dos estudos examinados focaram nos impactos dos herbicidas isoladamente, enquanto a outra metade investigou os efeitos combinados com outros agrotóxicos.

#### **INSETICIDAS**

Os grupos químicos dos inseticidas mais estudados foram os neonicotinoides (cinco estudos), seguidos pelos organofosforados (dois estudos), e, com um estudo cada, pirazol, carbamato, piretroide, cianopiretroide e sulfoxaminas (Figura 3). O imidacloprido foi o inseticida mais frequentemente analisado (cinco estudos), seguido pelo sulfoxaflor (três estudos). Outros inseticidas examinados incluem tiametoxam, tiaclopride (dois estudos cada), fipronil, clotianidina, acetamiprid, carbaril, fluvalinato, tetraclorantraniliprole, coumafós, tau-

fluvalinato, dimetoato, flumetrina e espinosade (um estudo cada). Seis estudos investigaram os efeitos combinados com outros agrotóxicos.

## FUNGICIDAS

Os principais grupos químicos dos fungicidas analisados nos estudos foram triazinas (três estudos), seguidos por estrobilurinas (dois estudos) e fenilpirazóis (um estudo) (Figura 3). Entre os fungicidas mais mencionados nos estudos estão o difenoconazol (dois estudos), seguido por piraclostrobina, triazol, flusilazol, fludioxonil, dimoxistrobina e tebuconazol (um estudo cada). Além disso, cinco trabalhos examinaram os efeitos combinados com outros agrotóxicos.

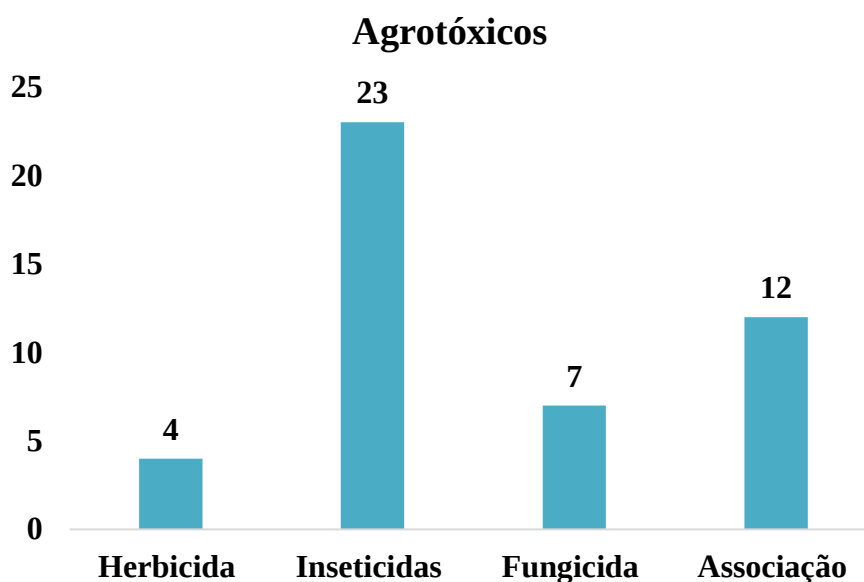


FIGURA 2: Número de estudos, distribuídos por classe de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ ou associação). Artigos que examinaram a associações dos efeitos de um ou mais agrotóxicos em um único estudo, podendo incluir mais de um inseticida, herbicida ou fungicida, em um mesmo trabalho.

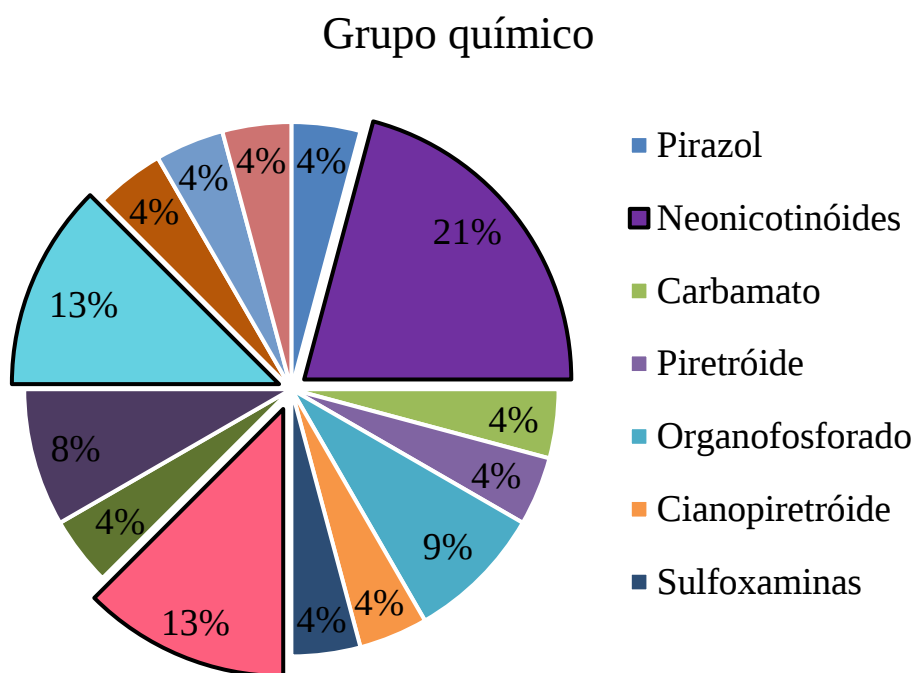


FIGURA 3: Estudos, distribuídos por grupo químico.

## DISCUSSÃO

As pautas relacionadas ao meio ambiente têm ganhado crescente destaque na mídia, trazendo à tona, a necessidade de gerir de forma sustentável os sistemas agrícolas. Além disso, é importante compreender os benefícios e riscos da utilização de agrotóxicos para os seres humanos e o ambiente, a fim de tomar decisões relacionadas à gestão agrícola (CULLEN *et al.*, 2019). Compreender os estudos sobre os agrotóxicos e seus grupos químicos é fundamental para entender os potenciais impactos sobre as abelhas.

O recente interesse político, público e científico nos efeitos dos agrotóxicos em organismos não-alvo promoveu diversas investigações sobre o tema. Na literatura já é possível encontrar revisões focadas nos impactos de uma única classe de inseticidas, como por exemplo os efeitos dos neonicotinóides em abelhas que rendeu 543 artigos em uma pesquisa inicial com 268 incluídos na revisão (LUNDIN *et al.*, 2015); em outra revisão focada em todas as classes de fungicidas e herbicidas, foi possível encontrar 437 artigos dos quais 90 foram relevantes para revisão (CULLEN *et al.*, 2019). Enquanto nesta revisão sistemática focada nos efeitos dos agrotóxicos no sistema antioxidante, inicialmente foram encontrados 309 artigos dos quais apenas 19, foram incluídos na revisão. Embora os agrotóxicos não tenham sido formulados para

atingir as abelhas, vem sendo comprovado por diversos estudos; o quão prejudiciais esses produtos são para as abelhas, sendo responsáveis pelo declínio destes polinizadores (ZALUSKI *et al.*, 2017; BOVI *et al.*, 2018; CAMILLI *et al.*, 2022; ASTOLFI *et al.*, 2022).

A maioria dos estudos encontrados foram realizados na China e no Brasil, sendo o ano de 2022 com maior número de publicação sobre o tema; diferindo dos resultados encontrados por Cullen *et al.*, 2019, uma vez que a maioria dos estudos por eles encontrados, foram realizados na América do Norte e Europa. No entanto, vale ressaltar que os agrotóxicos utilizados e suas composições podem variar mundialmente, e as condições em que são utilizados podem diferir significativamente entre as regiões do mundo. Embora sejam fortemente utilizados nos países com maior produção de alimento, em alguns países da Europa, por exemplo, já existe a proibição ao uso de alguns agrotóxicos, devido aos seus efeitos nocivos para a saúde das abelhas melíferas (ZHAO *et al.*, 2022).

Todos os artigos analisados centraram-se nos impactos de agrotóxicos em três genes específicos (*SOD*, *CAT* e *GST*) do sistema antioxidante em abelhas melíferas. Em nove dos 19 estudos, foi dada ênfase à avaliação conjunta desses três genes, evidenciando que a homeostase em abelhas individuais e colônias é mantida pela atuação coordenada do sistema imunológico e sistema antioxidante, e os sistemas atuam para mitigar os efeitos adversos originados de fatores externos, como a exposição a xenobióticos (DZIECHCIARZ *et al.*, 2023). Até o momento, foi confirmado que a eficácia do sistema antioxidante em abelhas operárias é influenciada por fatores ambientais externos, como agrotóxicos (CULLEN *et al.*, 2019; PALEOLOG *et al.*, 2021). Portanto, a exposição das abelhas aos agrotóxicos prejudica o sistema antioxidante, causando estresse oxidativo, um estado em que o sistema de defesa antioxidante não consegue neutralizar os efeitos danosos dos radicais livres.

Neste cenário, o estado fisiológico regula positivamente a atividade de enzimas como *SOD*, *CAT* e *GST* para proteger o organismo dos danos causados pelas ROS (MIGDAŁ *et al.*, 2020). Todos os nove estudos que investigaram os três genes relataram alterações na regulação dos genes após a exposição das abelhas aos agrotóxicos (LI *et al.*, 2021; PALEOLOG *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; ORČIĆ *et al.*, 2022; PAL *et al.*, 2022; ARAÚJO *et al.*, 2023; CANG *et al.*, 2023; PONS *et al.*, 2023; WHANG *et al.*, 2023). Esses resultados destacam a sensibilidade do sistema antioxidante das abelhas aos agrotóxicos e reforçam a importância de entender os efeitos dessas substâncias na saúde das colônias.

Os riscos desses compostos para as abelhas eram tradicionalmente avaliados por meio de testes de  $DL_{50}$ . No entanto, doses subletais podem causar efeitos tão prejudiciais quanto uma dosagem mais elevada, sendo capaz de causar aumento na peroxidação lipídica, alteração na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, atividades enzimáticas antioxidantes e danos oxidativos em abelhas (GAO *et al.*, 2022; PONS *et al.*, 2023). O número de estudos que investigam potenciais efeitos subletais dos agrotóxicos nas abelhas é baixo (três estudos focaram apenas em efeitos subletais, nove examinaram efeitos da dose letal e sete da dose ambientalmente relevante), tornando essa área digna de maior atenção.

A maioria dos estudos (cerca de 89%) investigou a exposição das abelhas em laboratório, enquanto apenas 11% foram realizados em campo. Isso evidencia escassez de pesquisas que avaliem os efeitos dos agrotóxicos na colônia como um todo, em vez de se concentrar apenas em abelhas em fases específicas. Estudos a campo fornecem dados importantes sobre a exposição real das abelhas e a forma como a colônia se comporta perante a contaminação, sendo de suma importância esse tipo de estudo para compreender melhor os efeitos dos agrotóxicos a campo. O elevado número de estudos em laboratório pode ser atribuído à toxicidade dos agrotóxicos, que podem causar danos significativos às abelhas, tais como atrofia das glândulas hipofaríngeas, redução da área dos ácinos, morte de larvas e a redução da cria (ZALUSKI *et al.*, 2017; TRAYNOR; LAMAS, 2021). Portanto, a contaminação das abelhas em ambiente controlado torna-se mais viável para os pesquisadores, evitando grandes perdas de indivíduos.

Em 100% dos estudos avaliados o método de exposição utilizado foi via ingestão de alimento contaminado, ignorando por completo outras vias de exposição, como a exposição por contato. Zaluski *et al.*, (2015), observaram que o inseticida fipronil apresenta maior toxicidade às abelhas que foram expostas por contato em comparação as abelhas que receberam o alimento contaminado, resultando em alterações comportamentais, como agitação, espasmos, tremores e paralisia. Bovi *et al.*, (2018), notaram em seu estudo, que o inseticida fipronil e o imidacloprido prejudicaram a locomoção das abelhas expostas por contato e ingestão. Estes resultados mostram que mesmo em doses baixas, como as utilizadas nos testes de exposição por contato, causam grandes prejuízos para as abelhas, ressaltando a importância de mais pesquisas que se concentrem nesse tipo de exposição.

Nesta revisão, focamos nos efeitos dos agrotóxicos no sistema antioxidante nas abelhas melíferas. No entanto, é importante reconhecer que também pode haver um conjunto de efeitos

secundários e/ou de repercussão não abordados aqui, como a polinização que é vital para a produção agrícola, pois além de aumentam seu valor econômico, também melhora a qualidade dos frutos. As culturas comerciais de grande escala e as agriculturas familiares sustentam as economias locais, desempenhando um papel socioeconômico significativo (BASUALDO *et al.*, 2022). A presença dessas atividades agrícolas é essencial não apenas para a produção de alimentos, mas também para a manutenção da biodiversidade local e para o suporte aos serviços ecossistêmicos, como a polinização.

Atualmente existem mais de 20.000 espécies de abelhas descritas em todo o mundo, cerca de 12 espécies desempenham papel significativo na polinização de culturas, como a abelha melífera ocidental (*Apis mellifera*), a abelha melífera oriental (*Apis cerana*), alguns zangões, melipona (sem ferrão) e abelhas solitárias (FEKETÉNÉ FERENCZI *et al.*, 2023). Os serviços prestados pelos polinizadores desempenham papel crucial, garantindo e ampliando o valor econômico da produção agrícola, sendo seus serviços considerados essenciais para a produção de alimentos e para as economias em níveis regional e global (FEKETÉNÉ FERENCZI *et al.*, 2023).

Fatores como o uso de agrotóxicos, incluindo o inseticida acetamipride e fungicidas inibidores do ergosterol, também impactam os serviços de polinização das abelhas (HAN *et al.*, 2019). Os resíduos desses agrotóxicos e produtos sintéticos persistem no néctar e pólen coletados pelas abelhas, resultando em neurotoxicidade, deficiência imunológica, alterações comportamentais e doenças crônicas (CHRISTEN *et al.*, 2018). Além de que a aplicação de agrotóxicos, como fungicidas, inseticidas e herbicidas, contribui para a contaminação, toxicidade e redução na qualidade e quantidade de nutrientes no pólen e néctar, impactando a saúde das colônias e ameaçando a sobrevivência das abelhas (JIANG *et al.*, 2018). Estes efeitos secundários do uso de agrotóxicos sobre as abelhas e o pasto apícola também pode ser o foco para pesquisas futuras.

Considerando a crescente quantidade de literatura científica sobre o tema abordado, ainda permanecem várias lacunas importantes de conhecimento em nosso entendimento atual e essas limitações englobam a escassez de estudos envolvendo espécies de abelhas, a baixa quantidade de pesquisas que abordam o contato e exposições internas, bem como a falta de atenção a determinados compostos em detrimento de outros. Para melhor compreender e minimizar os riscos dos agrotóxicos para as abelhas, são essenciais mais pesquisas, abrangendo diferentes vias de exposição, diversas espécies de estudo e um amplo espectro de compostos

investigados. Sendo importante preencher essas lacunas no futuro, afim de construir uma base solida de fundamentos capazes de contribuir para políticas públicas futuras e garantir a gestão sustentável dos sistemas agrícolas bem como a prestação contínua de serviços de polinização tanto às culturas como às plantas nativas.

Os resultados aqui elencados destacam a sensibilidade do sistema antioxidante das abelhas aos agrotóxicos, indicando que esses produtos podem impactar significativamente a regulação gênica das enzimas antioxidantes, fundamentais para a defesa do organismo contra o estresse oxidativo. Essa constatação ressalta a importância de continuar investigando os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas e reforça a necessidade de medidas de proteção e manejo adequado para garantir a saúde e a sobrevivência desses polinizadores essenciais.

## REFERÊNCIAS

- AL-DALAEN, S.M.; AL-QTAITAT, A.I. Review article: oxidative stress versus antioxidants. **American journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 2, n. 5, p. 60-71, 2014.
- ALMASRI, H.; TAVARES, D. A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J-C.; BELZUNCES, L. P. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111013, 2020.
- ARAÚJO, R. D.S.; LOPES, M.P.; VIANA, T.A.; BASTOS, D.S.S.; MACHADO-NEVES, M.; BOTINA, L.L.; MARTINS, G.F. Bioinsecticide spinosad poses multiple harmful effects on foragers of *Apis mellifera*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2023.
- ARTZ, D.R.; PITTS-SINGER, T.L. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0135688, 2015.
- ASTOLFI, A., KADRI, S.M., DE CASTRO LIPPI, I.C., MENDES, D.D., ALONSO, D.P., RIBOLLA, P.E.M., DE OLIVEIRA ORSI, R. Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 53, n. 6, p. 69, 2022.
- BARBOZA, H. T. G.; DO NASCIMENTO, X. P.; SILVA, O. F.; SOARES, A. G.; DACOSTA, J. B. Organophosphorus compounds and their role in agriculture. **Revista Virtual De Quimica**, v. 10, n. 1, p. 172-193, 2018.
- BARTLING, M.T.; THÜMECKE, S.; RUSSERT, J.H.; VILCINSKAS, A.; LEE, K.Z. Exposure to low doses of pesticides induces an immune response and the production of nitric oxide in honeybees. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6819, 2021.
- BASUALDO, M.; CAVIGLIASSO, P.; DE AVILA JR, R.S.; ALDEA-SÁNCHEZ, P.; CORREA-BENÍTEZ, A.; HARMS, J.M.; RAMOS, A.K.; ROJAS-BRAVO, V.;

SALVARREY, S. Current status and economic value of insect-pollinated dependent crops in Latin America. **Ecological Economics**, v. 196, p. 107395, 2022.

BENITO-MURCIA, M.; BOTÍAS, C.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M.; SOLER, F.; PEREZ-LOPEZ, M.; MÍGUEZ-SANTIYÁN, M.P.M.; MARTINEZ-MORCILLO, S. Evaluating the chronic effect of two varroacides using multiple biomarkers and an integrated biological response index. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 103920, 2022.

BERNAUER, O.M.; GAINES-DAY, H.R.; STEFFAN, S.A. Colonies of bumble bees (*Bombus impatiens*) produce fewer workers, less bee biomass, and have smaller mother queens following fungicide exposure. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 478-488, 2015.

BONCRISTIANI, H.; UNDERWOOD, R.; SCHWARZ, R.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 5, p. 613-620, 2012.

BOVI, T.S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R.O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.1, p.239-245, 2018.

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

CAMILLI, M. P.; KADRI, S. M.; ALVAREZ, M. V. N.; RIBOLLA, P. E. M.; ORSI, R. O. Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 282, 2022.

CANDY, D. J.; BECKER, A.; WEGENER, G. Coordination and integration of metabolism in insect flight. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 4, p. 497-512, 1997.

CANG, T.; LOU, Y.; ZHU, Y. C.; LI, W.; WENG, H., L.V, L.; WANG, Y. Mixture toxicities of tetrachlorantraniliprole and tebuconazole to honey bees (*Apis mellifera* L.) and the potential mechanism. **Environment International**, v. 172, p. 107764, 2023.

CHEN, Y.Z.; ZHANG, B.W.; YANG, J.; ZOU, C.S.; LI, T.; ZHANG, G.C.; CHEN, G.S. Detoxification, antioxidant, and digestive enzyme activities and gene expression analysis of *Lymantria dispar* larvae under carvacrol. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 24, n. 1, p. 208-216, 2021.

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

CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 4071-4081, 2016.

CHRISTEN, V.; FENT, K. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. **Environmental pollution**, v. 226, p. 48-59, 2017.

CHRISTEN, V.; KUNZ, P.Y.; FENT, K. Endocrine disruption and chronic effects of plant protection products in bees: Can we better protect our pollinators?. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1588-1601, 2018.

CLARKE, J. What is a systematic review?. **Evidence-based nursing**, v. 14, n. 3, p. 64-64, 2011.

COLIN, T.; MEIKLE, W.G.; WU, X.; BARRON, A.B. Traces of a neonicotinoid induce precocious foraging and reduce foraging performance in honey bees. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 14, p. 8252-8261, 2019.

CORONA, M.; ROBINSON, G.E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 687-701, 2006.

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

DAI, P.; JACK, C. J.; MORTENSEN, A. N.; BLOOMQUIST, J. R.; ELLIS, J. D. The impacts of chlorothalonil and diflubenzuron on *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 283-288, 2018.

DE ALMEIDA ROSSI, C.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 65, p. 234-243, 2013.

DECIO, P.; MIOTELO, L.; PEREIRA, F.D.C.; ROAT, T. C.; MARIN-MORALES, M.A.; MALASPINA, O. Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 223, p. 112581, 2021.

DOMINGUES, C. E.; ABDALLA, F. C.; BALSAMO, P. J.; PEREIRA, B. V.; DE ALENCAR HAUSEN, M.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DOS SANTOS, C.F.; ACOSTA, A.L.; DORNELES, A.L.; DOS SANTOS, P.D.; BLOCHTEIN, B. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31605, 2016.

DULIN, F.; ZATYLYNY-GAUDIN, C.; BALLANDONNE, C.; GUILLET, B.; BONAFOS, R., BUREAU, R.; HALM, M. P. Protecting honey bees: identification of a new varroacide by in silico, in vitro, and in vivo studies. **Parasitology Research**, v. 113, p. 4601-4610, 2014.

DZIECHCIARZ, P.; STRACHECKA, A.; BORSUK, G.; OLSZEWSKI, K. Effect of rearing in small-cell combs on activities of catalase and superoxide dismutase and total antioxidant capacity in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 709, 2023.

FAVARO, R.; BAUER, L. M.; ROSSI, M.; D'AMBROSIO, L.; BUCHER, E.; ANGELI, S. Botanical origin of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees during and after apple bloom. **Frontiers In Physiology**, v. 10, p. 1069, 2019.

FEAZEL-ORR, H. K.; CATALFAMO, K. M.; BREWSTER, C. C.; FELL, R. D.; ANDERSON, T. D.; TRAVER, B. E. Effects of pesticide treatments on nutrient levels in worker honey bees (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 7, n. 1, p. 8, 2016.

FEKETÉNÉ FERENCZI, A.; SZÚCS, I.; BAUERNE GÁTHY, A. Evaluation of the Pollination Ecosystem Service of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Based on a Beekeeping Model in Hungary. **Sustainability**, v. 15, n. 13, p. 9906, 2023.

FISHER, A.; RANGEL, J. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0208630, 2018.

FISHER, A.; COLEMAN, C.; HOFFMANN, C.; FRITZ, B.; RANGEL, J. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. **Journal Of Economic Entomology**, v. 110, n. 3, p. 802-808, 2017.

FISCHER, J.; MÜLLER, T.; SPATZ, A. K.; GREGGERS, U.; GRÜNEWALD, B.; MENZEL, R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91364, 2014.

FLORENCIA, F. M.; CAROLINA, T.; ENZO, B.; LEONARDO, G. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 360-368, 2017.

FREEMARK, K.; BOUTIN, C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 52, n. 2-3, p. 67-91, 1995.

GALVÃO, T. F.; PANSANI, T. de S. A.; HARRAD, D. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. **Epidemiologia E Serviços De Saúde**, v. 24, p. 335-342, 2015.

GAO, J.; YANG, Y.; MA, S.; LIU, F.; WANG, Q.; WANG, X.; WU, Y.; ZHANG, L.; LIU, Y.; DIAO, Q.; DAI, P. Combined transcriptome and metabolite profiling analyses provide insights into the chronic toxicity of carbaryl and acetamiprid to *Apis mellifera* larvae. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 16898, 2022.

GASHOUT, H. A.; GUZMAN-NOVOA, E.; GOODWIN, P. H.; CORREA-BENÍTEZ, A. Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. **Journal Of Insect Physiology**, v. 121, p. 104014, 2020.

GIGLIO, A.; VOMMARO, M. L. Dinitroaniline herbicides: a comprehensive review of toxicity and side effects on animal non-target organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 51, p. 76687-76711, 2022.

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

GUNSTONE, T.; CORNELISSE, T.; KLEIN, K.; DUBEY, A.; DONLEY, N. Pesticides and soil invertebrates: A hazard assessment. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, p. 122, 2021.

HAN, W.; YANG, Y.; GAO, J.; ZHAO, D.; REN, C.; WANG, S.; ZHAO, S.; ZHONG, Y. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. **Ecotoxicology**, v. 28, p. 399-411, 2019.

HE, B.; LIU, Z.; WANG, Y.; CHENG, L.; QING, Q.; DUAN, J.; XU, J.; DANG, X.; ZHOU, Z.; LI, Z. Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 228, p. 112709, 2021.

HENRY, M.; CERRUTTI, N.; AUPINEL, P.; DECOURTYE, A.; GAYRARD, M.; ODOUX, J. F.; PISSARD, A.; BRETAGNOLLE, V. Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1819, p. 20152110, 2015.

IBRAHIM, E. D. S.; ABD ALLA, A. E.; EL-MASARAWY, M. S.; SALEM, R. A.; HASSAN, N. N.; MOUSTAFA, M. A. Sulfoxaflor influences the biochemical and histological changes on honeybees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology**, p. 1-8, 2023.

IWASAKI, J. M.; HOGENDOORN, K. Non-insecticide pesticide impacts on bees: A review of methods and reported outcomes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 314, p. 107423, 2021.

JIANG, J.; MA, D.; ZOU, N.; YU, X.; ZHANG, Z.; LIU, F.; MU, W. Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). **Chemosphere**, v. 201, p. 159-167, 2018.

JIANG, D.; WANG, G.R.; YAN, S.C. The improved resistance against gypsy moth in *Larix olgensis* seedlings exposed to Cd stress association with elemental and chemical defenses. **Pest Management Science**, v. 76, n. 5, p. 1713-1721, 2020.

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

KODRÍK, D.; BEDNÁŘOVÁ, A.; ZEMANOVÁ, M.; KRISHNAN, N. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25788-25816, 2015.

KORENKO, S.; NIEDOBOVÁ, J.; KOLÁŘOVÁ, M.; HAMOUZOVÁ, K.; KYSILKOVÁ, K., & MICHALKO, R. The effect of eight common herbicides on the predatory activity of the agrobiont spider *Pardosa agrestis*. **BioControl**, v. 61, p. 507-517, 2016.

KRAUS, E. C.; STOUT, M. J. Direct and indirect effects of herbicides on insect herbivores in rice, *Oryza sativa*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6998, 2019.

KRUPKE, C. H.; HUNT, G. J.; EITZER, B. D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e29268, 2012.

LESKA, A.; NOWAK, A.; NOWAK, I.; GÓRCZYŃSKA, A. Effects of insecticides and microbiological contaminants on *Apis mellifera* health. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5080, 2021.

LI, Z.; YU, T.; CHEN, Y.; HEERMAN, M.; HE, J.; HUANG, J.; NIE, H.; SU, S. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 156, p. 36-43, 2019.

LI, J.; ZHAO, L.; QI, S.; ZHAO, W.; XUE, X.; WU, L.; HUANG, S. Sublethal effects of Isoclast™ Active (50% sulfoxafloer water dispersible granules) on larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 112379, 2021.

LI, Z.; DUAN, J.; CHEN, L.; WANG, Y.; QIN, Q.; DANG, X.; ZHOU, Z. Melatonin enhances the antioxidant capacity to rescue the honey bee *Apis mellifera* from the ecotoxicological effects caused by environmental imidacloprid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 239, p. 113622, 2022.

LIMA, M. A. P.; MARTINS, G. F.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 733-747, 2016.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016.

LUNDIN, O.; RUNDLÖF, M.; SMITH, H. G.; FRIES, I.; BOMMARCO, R. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0136928, 2015.

MAIN, A. R.; HLADIK, M. L.; WEBB, E. B.; GOYNE, K. W.; MENGEL, D. Beyond neonicotinoids—wild pollinators are exposed to a range of pesticides while foraging in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140436, 2020.

MICHALKOVÁ, V.; PEKÁR, S. How glyphosate altered the behaviour of agrobiont spiders (Araneae: Lycosidae) and beetles (Coleoptera: Carabidae). **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 444-449, 2009.

MIGDAŁ, P.; MURAWSKA, A.; STRACHECKA, A.; BIENKOWSKI, P.; ROMAN, A.

Changes in the honeybee antioxidant system after 12 h of exposure to electromagnetic field frequency of 50 hz and variable intensity. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 713, 2020.

NAIARA GOMES, I.; INGRED CASTELAN VIEIRA, K.; MOREIRA GONTIJO, L.; CANTO RESENDE, H. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 97-107, 2020.

NETTLES, R.; WATKINS, J.; RICKS, K.; BOYER, M.; LICHT, M.; ATWOOD, L. W.; PEOPLES, M.; SMITH, R. G.; MORTENSEN, D. A.; KOIDE, R. T. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 61-69, 2016.

NIEMEYER, J. C., DE SANTO, F. B., GUERRA, N., RICARDO FILHO, A. M., & PECH, T. M. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018.

NIKOLIĆ, T.V.; KOJIĆ, D.; ORČIĆ, S.; BATINIĆ, D.; VUKAŠINOVIĆ, E.; BLAGOJEVIĆ, D.P.; PURAĆ, J. The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb, and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase, and catalase in laboratory conditions. **Chemosphere**, v.164, p.98-105, 2016.

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

ORČIĆ, S. M.; ČELIĆ, T. V.; PURAĆ, J. S.; VUKAŠINOVIĆ, E. L.; KOJIĆ, D. K. Acute toxicity of sublethal concentrations of thiacloprid and clothianidin to immune response and oxidative status of honey bees. **Apidologie**, v. 53, n. 4, p. 50, 2022.

PAL, E.; ALMAS RI, H.; PARIS, L.; DIOGON, M.; PIOZ, M.; COUSIN, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; TAVARES, D. A.; DELBAC, F.; BLOT, N.; BRUNET, J-L.; BELZUNCES, L. P. Toxicity of the pesticides imidacloprid, difenoconazole and glyphosate alone and in binary and ternary mixtures to winter honey bees: effects on survival and antioxidative defenses. **Toxics**, v. 10, n. 3, p. 104, 2022.

PALEOLOG, J.; WILDE, J.; MISZCZAK, A.; GANCARZ, M.; STRACHECKA, A. Antioxidation defenses of *Apis mellifera* queens and workers respond to imidacloprid in different age-dependent ways: Old queens are resistant, foragers are not. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1246, 2021.

PARKINSON, R. H.; FECHER, C.; GRAY, J. R. Chronic exposure to insecticides impairs honeybee optomotor behaviour. **Frontiers in Insect Science**, v. 2, 2022.

PLEASANTS, J. M.; OBERHAUSER, K. S. Milkweed loss in agricultural fields because of herbicide use: effect on the monarch butterfly population. **Insect Conservation and Diversity**, v. 6, n. 2, p. 135-144, 2013.

PONS, D. G.; HERRERA, C.; TORRENS-MAS, M.; LEZA, M.; SASTRE-SERRA, J. Sublethal doses of glyphosate modulates mitochondria and oxidative stress in honeybees by direct feeding. **Archives of insect biochemistry and physiology**, p. e22028, 2023.

PROSSER, R. S.; ANDERSON, J. C.; HANSON, M. L.; SOLOMON, K. R.; SIBLEY, P. K. Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 232, p. 59-72, 2016.

QI, S.; NIU, X.; HUI WANG, D.; WANG, C.; ZHU, L.; XUE, X.; ZHANG, Z.; WU, L. Flumethrin at sublethal concentrations induces stresses in adult honey bees (*Apis mellifera* L.). **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134500, 2020.

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

RUSSO, L.; BUCKLEY, Y. M.; HAMILTON, H.; KAVANAGH, M.; STOUT, J. C. Low concentrations of fertilizer and herbicide alter plant growth and interactions with flower-visiting insects. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 304, p. 107141, 2020.

SAGONA, S.; BETTI, L.; CASINI, L.; PALEGO, L.; GIANNACCINI, G.; FELICIOLI, A. Antioxidant enzymes activity during age polyethism in *Apis mellifera* L., 1758. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 879-889, 2021.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of Pesticides on Honey Bees. **Beekeeping And Bee Conservation - Advances In Research**, p. 77-97, 2016.

SÁNCHEZ-MORENO, S.; CASTRO, J.; ALONSO-PRADOS, E.; ALONSO-PRADOS, J. L.; GARCÍA-BAUDÍN, J. M.; TALAVERA, M.; DURÁN-ZUAZO, V. H. Tillage and herbicide decrease soil biodiversity in olive orchards. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 691-700, 2015.

SHARMA, A.; JHA, P.; REDDY, Gadi VP. Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. **Science Of The Total Environment**, v. 643, p. 1522-1532, 2018.

STELLIN, F.; GAVINELLI, F.; STEVANATO, P.; CONCHERI, G.; SQUARTINI, A.; PAOLETTI, M. G. Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy. **Applied Soil Ecology**, v. 123, p. 802-808, 2018.

TAN, K.; YANG, S.; WANG, Z.; MENZEL, R. Effect of flumethrin on survival and olfactory learning in honeybees. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66295, 2013.

TAN, K.; CHEN, W.; DONG, S.; LIU, X.; WANG, Y.; NIEH, J. C. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10989, 2015.

TAWFIK, A. I.; AHMED, Z. H.; ABDEL-RAHMAN, M. F.; MOUSTAFA, A. M. Influence of winter feeding on colony development and the antioxidant system of the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 752-763, 2020.

THANOMSIT, C.; SAOWAKOON, S.; WATTANAKORNSIRI, A.; NANUAM, J.; PRASATKAEW, W.; NANTHANAWAT, P.; MONGKOLVAI, P.; CHALORCHAROENYING, W. The glyphosate (Roundup): fate in aquatic environment,

adverse effect and toxicity assessment in aquatic organisms. **Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)**, v. 28, n. 1, p. 65-81, 2020.

TRAYNOR, K. S.; LAMAS, Z. S. Social disruption: Sublethal pesticides in pollen lead to *Apis mellifera* queen events and brood loss. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 112105, 2021.

TODD, O. E.; FIGUEIREDO, M. R.; MORRAN, S.; SONI, N.; PRESTON, C.; KUBEŠ, M. F.; NAPIER, R.; GAINES, T. A. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, v. 300, p. 110631, 2020.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1201, 2017.

TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15132, 2017.

WANG, H.; LU, Z.; LI, M.; FANG, Y.; QU, J.; MAO, T.; CHEN, J.; LI, F.; SUN, H.; LI, B. Responses of detoxification enzymes in the midgut of *Bombyx mori* after exposure to low-dose of acetamiprid. **Chemosphere**, v. 251, p. 126438, 2020.

WANG, D.; LV, L.; GAO, Z.; ZHU, Y. C.; WENG, H.; YANG, G.; WANG, Y. Joint toxic effects of thiamethoxam and flusilazole on the adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental Pollution**, v. 317, p. 120806, 2023.

WU, J.; GE, L.; LIU, F.; SONG, Q.; STANLEY, D. Pesticide-induced planthopper population resurgence in rice cropping systems. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 409-429, 2020.

WU, X.; LIAO, C.; HE, X.; ZHANG, L.; YAN, W.; ZENG, Z. Sublethal fluvalinate negatively affect the development and flight capacity of honeybee (*Apis mellifera* L.) workers. **Environmental Research**, v. 203, p. 111836, 2022.

ZALUSKI, R.; KADRI, S.M.; ALONSO, D.P.; ROBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 34, No. 5, pp. 1062–1069, 2015.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN JR, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15217, 2017.

ZALUSKI, R.; BITTARELLO, A. C.; VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; PADILHA, P. D. M.; FERNANDES, M. D. S.; BOVI, S. T.; ORSI, R. D. O. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2190, 2020.

ZHAO, H.; LI, G.; GUO, D.; WANG, Y.; LIU, Q.; GAO, Z.; WANG, H.; LIU, Z.; GUO, X.; XU, B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140819, 2020.

ZHAO, H.; LI, G.; CUI, X.; WANG, H.; LIU, Z.; YANG, Y.; XU, B. Review on effects of some insecticides on honey bee health. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105219, 2022.

ZOU, C.; LV, C.; WANG, Y.; CAO, C.; ZHANG, G. Larvicidal activity and insecticidal mechanism of *Chelidonium majus* on *Lymantria dispar*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 123-132, 2017.

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

## CAPÍTULO 3

---

**Agrotóxicos alteram a expressão de genes do sistema antioxidante de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras**

IRC MOREIRA<sup>1</sup>, JL SCHEFFER<sup>1</sup>, ICC LIPPI<sup>1</sup>, YS LIMA<sup>1</sup>, SM KADRI<sup>1</sup>, MVN ALVAREZ<sup>2</sup>, RO ORSI<sup>1\*</sup>

1Center of Education, Science and Technology in Rational Beekeeping (NECTAR), College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP, São Paulo State University, Botucatu, Brazil- +55 (14) 3880-2946 – \*Corresponding author: Ricardo de Oliveira Orsi, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ - Campus Botucatu Distrito de Rubião Junior s/n Caixa Postal 560, CEP:18618-970, e-mail: ricardo.orsi@unesp.br.

2Institute of Biotechnology, UNESP - São Paulo State University, São Paulo, Botucatu, Brazil.

## RESUMO

As abelhas campeiras forrageiam longas distâncias a procura de recursos alimentares, o que as deixam susceptíveis ao estresse oxidativo, com acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que afetam sua longevidade e capacidade cognitiva, efeito esses agravados pela exposição a agrotóxicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade diferentes classes de agrotóxicos sendo: herbicida (glifosato), inseticidas (fipronil e imidaclopride) e fungicida (piraclostrobina) no perfil de expressão gênica do sistema antioxidante de abelhas na fase de campeiras, por meio de análise de transcriptoma. Para isso foram utilizadas abelhas com mais de 21 dias previamente marcadas e expostas, via contato ou ingestão, com a dose letal ( $DL_{50}$ ) e/ou dose subletal ( $DL_{50/100}$ ) dos agrotóxicos, no período de exposição de 1 e 4 horas. Foram observadas alterações na expressão de 18 genes a exposição aos agrotóxicos utilizados, sendo o fipronil o que mais afetou o sistema antioxidante das abelhas, seguido pelo inseticida imidaclopride, glifosato e piraclostrobina. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam o impacto dos agrotóxicos na regulação dos genes do sistema antioxidante das abelhas *Apis mellifera* africanizadas durante a fase de campeira e sugerem efeitos prejudiciais dos inseticidas no sistema antioxidante das abelhas. Essas alterações podem ter consequências significativas para a saúde e o bem-estar das abelhas, bem como para a saúde dos ecossistemas onde desempenham papel vital como polinizadores. Os resultados reforçam a necessidade de compreender os efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas para desenvolver estratégias de manejo agrícola mais sustentáveis e proteger a biodiversidade.

**Palavras-chaves:** apicultura; expressão gênica; polinização; transcriptoma.

## Abstract

Forager bees will travel extensive forage distances in pursuit of resources, which makes them susceptible to oxidative stress, with an accumulation of reactive oxygen species (ROS) that affect their longevity and cognitive capacity, an effect aggravated by exposure to pesticides. The aim of this study is to evaluate the toxicity of different classes of pesticides: herbicide (glyphosate), insecticide (fipronil and imidacloprid) and fungicide (pyraclostrobin) on the gene expression profile of the antioxidant system of bees in the forager phase, using transcriptome analysis. For this purpose, bees over 21 days old were previously marked and exposed, via contact or ingestion, to the lethal dose (LD<sub>50</sub>) and/or sublethal dose (LD<sub>50/100</sub>) of the pesticides, during exposure times of 1 and 4 hours. Changes were observed in the expression of 18 genes when exposed to the pesticides used, with fipronil having the greatest effect on the bees' antioxidant system, followed by the insecticides imidacloprid, glyphosate and pyraclostrobin. The results obtained in this study highlight the impact of pesticides on the regulation of genes in the antioxidant system of Africanized *Apis mellifera* bees during the hive phase and suggest the detrimental effects of insecticides on the antioxidant system of bees. These changes could have significant consequences for the health and well-being of bees, as well as for the health of ecosystems where they play a vital role as pollinators. The results reinforce the need to understand the effects of pesticides on bees in order to develop more sustainable agricultural management strategies and protect biodiversity.

**Keywords:** beekeeping; gene expression; pollination; transcriptome.

## INTRODUÇÃO

A diminuição da população de abelhas *Apis mellifera* afeta diretamente a produção apícola, reprodução e dinâmica populacional de diversas plantas (POTTS *et al.*, 2016). O aumento da mortalidade das abelhas está relacionado a diversos fatores, incluindo parasitas, patógenos e uso de agrotóxicos (HENRY *et al.*, 2012; O'NEAL *et al.*, 2018; STEINHAEUER *et al.*, 2018). Embora os agrotóxicos como os inseticidas, acaricidas, herbicidas e fungicidas promovam muitos benefícios para a agricultura (COOPER; DOBSON, 2007), também existem diversos riscos associados à sua utilização, como o aparecimento de resistência a pragas, ressurgimento e surtos secundários de doenças, bem como contaminação ambiental, riscos à saúde humana e animal (SILVA *et al.*, 2019).

Estes produtos acabam afetando organismos não-alvo como as abelhas (RAIMETS *et al.*, 2020; CALIANI *et al.*, 2021). Estas podem se contaminar de forma direta, quando as campeiras fazem o forrageamento no momento da aplicação de agrotóxicos ou de forma indireta, ao coletarem e levarem recursos (pólen, néctar, água e resina) contaminados para a colônia, podendo provocar diversos problemas comportamentais e fisiológicos, promovendo o enfraquecimento ou morte da colônia (ZALUSKI *et al.*, 2015; FINE *et al.*, 2017; CULLEN *et al.*, 2019).

Os agrotóxicos são substâncias usadas para matar ou restringir o desenvolvimento de organismos (BOLOGNESI; MERLO, 2011), que englobam fungicidas, herbicidas e inseticidas, são processados pelo organismo, podendo ser metabolizados, armazenados, excretados ou bioacumulados. Sua entrada no organismo pode ocorrer por diferentes vias, como pulverização, contato ou ingestão (LESKA *et al.*, 2021).

Dentre os agrotóxicos, o herbicida glifosato (N-fosfonometil-glicina) é utilizado no controle de plantas daninhas, sendo classificado como não-seletivo e de amplo espectro, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas. Seu uso causa prejuízos a manutenção das populações de abelhas, já que pode reduzir a diversidade floral (GUPTA *et al.*, 2019), além de causar alterações em aspectos comportamentais, fisiológicos (BLOT *et al.*, 2019; MOTTA; MORAN, 2020; VÁZQUEZ *et al.*, 2020a), no desenvolvimento populacional (VÁZQUEZ *et al.*, 2018), genéticos (VÁZQUEZ *et al.*, 2020b) e produtivos.

Já o inseticida imidaclopride é classificado como neonicotinóide que contém nitro, um grupo geralmente mais tóxico que aqueles que contém ciano, que incluem acetamipride e

tiaclopride (PISA *et al.*, 2015). Os neonicotinoides estão entre os mais utilizados no mundo e por esse motivo são um dos principais alvos de pesquisa para investigar possível relação com elevadas taxas de mortalidade de abelhas (BLACQUIERE *et al.*, 2012; SIMON-DELSO *et al.*, 2015). O imidaclopride afeta negativamente o comportamento, locomoção e atividades motoras (BOVI *et al.*, 2018), aprendizado e memória (CHRISTEN *et al.*, 2016), desenvolvimento de colônias (ELSTON *et al.*, 2013) e o sucesso de forrageamento (HENRY *et al.*, 2012). Os neonicotinoides podem induzir efeitos transcricionais significativos em diversos genes-chave associados à neurotoxicidade, reações ao estresse e expectativa de vida, além da regulação do sistema imunológico (CHRISTEN *et al.*, 2016; CHRISTEN; FENT, 2017).

O fipronil é inseticida de ação sistêmica fenil-pirazol, atuando diretamente no sistema nervoso central dos insetos, como antagonista de neurotransmissores, ligando-se aos receptores do canal de cloro, impedindo ação do GABA e a entrada dos íons de Cl<sup>-</sup> no neurônio pós-sináptico, tornando o fluxo dos impulsos nervosos constante, promovendo hiperexcitação do sistema nervoso central (KASHIWAQUI; GUERREIRO, 2015), seguida de paralisia e morte do inseto (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). Estudos mostram que abelhas expostas ao fipronil apresentam danos morfológicos, fisiológicos e no metabolismo. As abelhas *A. mellifera* expostas a este inseticida apresentaram prejuízos na aprendizagem, desempenho da memória e atividade motora (ZALUSKI *et al.*, 2015; KAIRO *et al.*, 2017; ASTOLFI *et al.*, 2022).

Por outro lado, o piraclostrobina é um fungicida pertencente as estrobilurinas de amplo espectro, com baixa estabilidade e movimentação translaminar em plantas, inibindo o complexo III da respiração celular (BARTLETT *et al.*, 2002). Em abelhas contaminadas pode causar mudanças comportamentais (TADEI *et al.*, 2019), alterações celulares e na microbiota intestinal (ANDERSON *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2020), facilitando assim a infecção por patógenos como o *Nosema ceranae* (ZALUSKI *et al.*, 2017; GLAVINIC *et al.*, 2019).

A exposição das abelhas aos agrotóxicos pode afetar diversas vias específicas de seu organismo (ASTOLFI *et al.*, 2022), como a via antioxidante. Estudos têm mostrado que os agrotóxicos podem causar estresse oxidativo e outras disfunções, podendo levar a mortalidade de grande número de organismos (BOU-ABDALLAH, 2010; AL-DALAEN; AL-QTAITAT, 2014; HE *et al.*, 2021). Para combater os efeitos dos radicais livres é necessário um sistema antioxidante eficiente, este processo é realizado por meio de enzimas, dentre as quais pode-se

citar a *catalase (CAT)*, *glutathiona peroxidase (GPx)* (MARGOTTA *et al.*, 2018), *superóxido desmutase (SOD)* e a *tiorredoxinas (TRXs)*.

O sistema antioxidante dos insetos é de extrema importância, pois esses animais naturalmente geram grandes quantidades de radicais livres, associado ao seu rápido metabolismo (TAWFIK *et al.*, 2020). Sua função é neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo organismo, protegendo contra seus efeitos danosos por meio da atividade enzimática e não enzimática (STRACHECKA *et al.*, 2018). Os mecanismos antioxidantes enzimáticos contam com aproximadamente 38 genes antioxidantes, como a catalase, glutathionas, superóxido dismutases e a glutathiona-S-transferase, as quais estão entre as principais enzimas do metabolismo desempenhando papel importante na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e metabolismo de xenobióticos (SHI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020; PALEOLOG *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo é reflexo de um desequilíbrio entre a manifestação sistêmica do ROS e a capacidade do organismo de neutralizá-las (KRAMER *et al.*, 2021). A produção de ROS ocorre principalmente durante o processo de respiração celular na cadeia de transporte de elétrons (ETC), nas mitocôndrias (BRAND, 2010). O vazamento de elétrons no Complexo ETC I e Complexo III leva à redução parcial do oxigênio para formar radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), os quais são rapidamente dismutados em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD) e são posteriormente inativados pela catalase (CAT). Ambas moléculas liberadas neste processo ( $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ ), são considerados ROS (CERVONI *et al.*, 2017).

Atividades como reprodução, voo e forrageamento promovem aumento na produção de ROS, os quais são subprodutos do metabolismo mitocondrial que podem causar estresse oxidativo ao danificar biomoléculas importantes, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (SELMAN *et al.*, 2012). As ROS são tóxicas para as células quando sua produção é excessiva, como ocorre durante a atividade de forrageamento. O aumento de compostos altamente reativos pode promover danos ao organismo, dentre os quais, o envelhecimento precoce (MARGOTTA *et al.*, 2018). Além disso a ROS pode sobrecarregar os sistemas de defesa, especialmente em organismos com altas taxas metabólicas, como no caso das abelhas.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de três classes distintas de agrotóxicos: herbicida (glifosato), inseticida (fipronil e imidaclopride) e fungicida (piraclostrobina), utilizando-se dose letal ( $DL_{50}$ ) e subletal ( $DL_{50/100}$ ) na alteração no perfil de

expressão gênica do sistema antioxidante decorrente da exposição por ingestão e contato, em abelhas na fase de campeiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do experimento e grupos experimentais

O presente estudo foi conduzido nas seguintes coordenadas geográficas: 22°49' de latitude Sul e 48°24' de longitude Oeste. Foram utilizadas dez colônias de *Apis mellifera* alojadas em núcleos padrão americano e padronizadas com três quadros de cria e dois de alimento (pão de abelha e mel), todos contendo rainhas acasaladas naturalmente.

Dois quadros contendo cria operculada foram removidos de cada colônia experimental, e em seguida, envoltos em tecido perfurado e devolvidos às suas respectivas colmeias (CAMILLI *et al.*, 2022). Posteriormente, aproximadamente 100 abelhas recém-emergidas de cada colmeia experimental foram individualmente marcadas no tórax usando caneta Posca (Mitsubishi Pencil, Tóquio, Japão), totalizando aproximadamente 1.000 abelhas. Após o processo de marcação, as abelhas foram reintroduzidas em suas colônias originais (DE BARROS *et al.*, 2021; ASTOLFI *et al.*, 2022), e vinte e um dias após a reintrodução, as abelhas marcadas já na fase de campeira, foram coletadas e imediatamente distribuídas de forma aleatória, em placas de Petri perfuradas (5 abelhas/repetição) para garantir a ventilação, separadas de acordo com o método de exposição, tempo, dosagem e agrotóxico. Para cada tratamento foram utilizadas 120 abelhas, ao todo foram utilizadas 480 abelha para as análises em laboratório. Os experimentos foram realizados em sextuplicata.

As abelhas foram mantidas em incubadora com temperatura e umidade controladas ( $32^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  e 70% UR), mantidas em jejum pelo período de 3 horas para esvaziamento da vesícula nectarífera. Em seguida, foram contaminadas ou não, por ingestão de alimento contaminado (xarope de mel 1:1) contendo a DL50 ou subletal (DL50/100) dos agrotóxicos utilizados. Foi considerado o consumo de 50  $\mu\text{L}$  por abelha, correspondente ao volume médio da vesícula melífera (THOMPSON; HUNT, 1999), para o cálculo das concentrações. Os agrotóxicos foram ofertados para as abelhas em 1ml de alimento em tubo plástico (50  $\times$  10  $\times$  10 mm), contendo as respectivas doses.

As abelhas expostas por contato, contaminadas ou não, na região do pronoto com dose letal (DL<sub>50</sub>) ou a subletal (DL<sub>50/100</sub>) dos agrotóxicos utilizados. As doses utilizadas no

estudo foram:

- Glifosato -  $DL_{50} = 273,93 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $= 2,73 \mu\text{g/abelha}$  para ingestão e para contato  $DL_{50} = 255,73 \mu\text{g/abelha}$  e subletal  $= 2,55 \mu\text{g/abelha}$ . Ambas as doses foram pré-determinadas pelo grupo pesquisa NECTAR (dados não publicados);
- Imidaclopride -  $DL_{50} = 0,081 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,0008 \mu\text{g/abelha}$  para ingestão e para contato letal  $DL_{50} = 0,063 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,0006 \mu\text{g/abelha}$  (BOVI *et al.*, 2018).
- Fipronil -  $DL_{50} = 0,019 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,0019 \mu\text{g/abelha}$  para ingestão e para contato letal  $DL_{50} = 0,009 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,00009 \mu\text{g/abelha}$  (ZALUKI *et al.*, 2015).
- Piraclostrobina contendo a  $DL_{50} = 8,85 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,088 \mu\text{g/abelha}$  para ingestão e para contato letal  $DL_{50} = 12,89 \mu\text{g/abelha}$  e subletal ( $DL_{50/100}$ )  $0,1289 \mu\text{g/abelha}$  (ZALUSKI *et al.*, 2017).

Após 1 e 4 horas de exposição, as abelhas foram coletadas e imediatamente alocadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior realização das análises de transcriptoma, utilizando diferentes abelhas para cada tempo.

### **Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq**

O método utilizado para a extração do RNA total das cabeças das abelhas de cada réplica foi o Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), quantificado em fluorímetro Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) em gel de agarose (CHOMCZYNSKI, 1993). O RNA foi extraído na íntegra da cauda poli-A. Os pools de RNA total foram utilizados para preparação das bibliotecas para o sequenciamento de RNA Illumina (RNA-Seq) com a utilização do kit SureSelect Stard Specific RNA Library Preparation (Agilent Tecnologies, Santa Clara, USA) seguindo as instruções do fabricante.

As bibliotecas foram quantificadas por qPCR no aparelho StepOne Plus (Life Technologies) com o uso do NEBNext Library Quant Kit for Illumina® (New England BioLabs® inc.). Posteriormente as bibliotecas foram diluídas a 12pM, carregadas no flowcell presente no NextSeq (Illumina, San Diego, EUA) e sequenciadas pelo método sequence by synthesis (SBS) por 50 ciclos no aparelho NextSeq, em uma única execução com comprimento de leitura de 150 bp.

### **Processamento dos dados RNA-Seq e análise de diferenças de expressões gênicas**

O programa FASTQC foi usado para verificar o conteúdo do adaptador e avaliar a qualidade das leituras brutas. O alinhamento dos dados foi realizado com Burrows-Wheeler

Aligner (BWA) v0.7.12, utilizando o Amel\_HAv3.1 do NCBI (RefSeq assembly accession: GCF\_003254395.2) como referência. A matriz de contagem de recursos foi criada usando HTSeq v0.11.2 e o arquivo de anotação GTF de Amel\_HAv3.1.

A análise dos dados, visualização e plotagem foram realizadas usando o RStudio para a linguagem R, incluindo o pacote ggplot2 v3.3.2. A análise de expressão diferencial foi realizada usando o pacote edgeR v3.30.3 disponível no projeto de software Bioconductor para a linguagem R. Os genes de baixa expressão foram filtrados mantendo os genes que tiveram a contagem por milhão maior que um em pelo menos duas das amostras. As contagens foram normalizadas usando a normalização TMM. O modelo log-linear generalizado binomial negativo foi usado na análise de expressão diferencial, e o procedimento de Benjamini & Hochberg, (1995) (FDR) foi usado para correções de testes múltiplos. Os genes foram considerados significativamente regulados com valor de  $p$  ajustado  $< 0,05$  e  $|\log_2 FC| \geq 2$ .

### Genes do sistema antioxidante

Foram avaliados os 38 genes do sistema antioxidante de abelhas melíferas até o presente momento descritos (CORONA; ROBINSON, 2006), na análise de transcriptoma (Tabela 1).

TABELA 1: Genes do sistema antioxidante e sua abreviação.

| Genes do sistema antioxidantes                       | Abreviação       |
|------------------------------------------------------|------------------|
| <i>Catalase</i>                                      | <i>Cat</i>       |
| <i>Copper chaperone for superoxide dismutase</i>     | <i>Ccs</i>       |
| <i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>     | <i>Trx-like3</i> |
| <i>Glutaredoxin 3</i>                                | <i>Trx/gtx</i>   |
| <i>Glutaredoxin-C4</i>                               | <i>Grx1</i>      |
| <i>Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial</i> | <i>Grx2</i>      |
| <i>Glutathione S-transferase D1</i>                  | <i>Gstd1</i>     |
| <i>Glutathione peroxidase-like 1</i>                 | <i>Gtpx1</i>     |
| <i>Glutathione S-transferase 1-1</i>                 | <i>Gstu1</i>     |
| <i>Glutathione S-transferase S1</i>                  | <i>Gsts1</i>     |
| <i>Glutathione S-transferase S2</i>                  | <i>Gsts2</i>     |
| <i>Glutathione S-transferase S3</i>                  | <i>Gsts3</i>     |

|                                                                   |                     |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>Glutathione S-transferase S4</i>                               | <i>Gsts4</i>        |
| <i>Glutathione S-transferase theta-3</i>                          | <i>Gstt1</i>        |
| <i>LOC411159</i>                                                  | <i>Grx-like1</i>    |
| <i>LOC413369</i>                                                  | <i>Rsod</i>         |
| <i>Methionine sulfoxide reductase A</i>                           | <i>Msra</i>         |
| <i>Methionine-R-sulfoxide reductase B1</i>                        | <i>Msrb</i>         |
| <i>Microsomal glutathione S-transferase 1</i>                     | <i>Gstmic1</i>      |
| <i>Microsomal glutathione S-transferase 2</i>                     | <i>Gstmic2</i>      |
| <i>Peroxiredoxin 1</i>                                            | <i>Tpx1</i>         |
| <i>Peroxiredoxin-6</i>                                            | <i>Tpx6</i>         |
| <i>Peroxiredoxin-like family protein</i>                          | <i>Trx-like2</i>    |
| <i>Probable maleylacetoacetate isomerase 2</i>                    | <i>Gstz1</i>        |
| <i>Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase</i> | <i>Gtpx2</i>        |
| <i>Pyrimidodiazepine synthase</i>                                 | <i>Gsto1/ Gsto2</i> |
| <i>Superoxide dismutase 1</i>                                     | <i>Sod1</i>         |
| <i>Superoxide dismutase 2</i>                                     | <i>Sod2</i>         |
| <i>Superoxide dismutase 3</i>                                     | <i>Sod3</i>         |
| <i>Thioredoxin peroxidase 3</i>                                   | <i>Tpx3</i>         |
| <i>Thioredoxin peroxidase 4</i>                                   | <i>Tpx4</i>         |
| <i>Thioredoxin reductase 1</i>                                    | <i>Trxr-1</i>       |
| <i>Thioredoxin, mitochondrial</i>                                 | <i>Trx-1</i>        |
| <i>Thioredoxin-2</i>                                              | <i>Trx-2</i>        |
| <i>Thioredoxin-like protein 1</i>                                 | <i>Trx-like1</i>    |

---

As sequências obtidas foram alinhadas contra o genoma de referência de *Apis mellifera* disponível online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>. A análise da expressão gênica é baseada no número de reads para um mesmo fragmento gênico: quanto maior o número de reads encontrado, maior é a expressão desse gene. A plataforma CLC Genomics Workbench 5.1 (CLC Bio, Dinamarca), foi utilizada para fazer os cálculos das medidas de expressão gênica

a partir das sequências de mRNA e a geração de perfis de expressão gênica. As análises estatísticas foram geradas em R®.

### **Correlação entre os genes e rotas gênicas**

A Reactome Knowledgebase é uma base de dados online e de código aberto, que se destaca por concentrar esforço de anotação manual em diversas espécies, e por aplicar um único modelo de dados consistente em todos os domínios da biologia. Os processos são sistematicamente descritos em detalhes moleculares para gerar uma rede ordenada de transformações moleculares, resultando em uma versão estendida de um mapa metabólico clássico (FABREGAT *et al.*, 2018). A Reactome Knowledgebase liga sistematicamente as proteínas às suas funções moleculares, fornecendo um recurso que funciona tanto como um arquivo de processos biológicos como uma ferramenta para descobrir novas relações funcionais em dados como estudos de expressão genética ou catálogos de mutações somáticas em células (JASSAL *et al.*, 2020). Para isso, os dados de interesse obtidos através da análise de transcrito foram adicionados ao Reactome, onde após a análise foi possível observar as possíveis interações entre os genes estudados

### **Análise Estatística**

Com a base de dados do experimento obtida, foi realizada a análise de bioinformática para obtenção das expressões dos genes alvo deste projeto. Para a análise estatística foi utilizado o pacote rna seq gene do programa R®, para dados gerados do sequenciamento em plataforma Illumina. Diferenças entre os tratamentos foram comparadas por ANOVA, seguida do teste de Bonferroni ( $p < 0,01$ ) para múltiplas comparações (ZAR, 1996). O teste exato de Fisher foi considerado o método estatístico (valor de  $p < 0,05$ ) e o método BENJAMINI e HOCHBERG (1995) foi utilizado para correção da taxa de falsa descoberta ( $< 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Após 1 hora de exposição ao alimento contaminado com inseticida imidaclopride foi observado suprarregulação de sete genes com a dose subletal (Tabela 2). Já o inseticida fipronil, teve 11 genes suprarregulados na dose subletal e nove genes na dose letal ( $DL_{50}$ ), enquanto um gene foi infraregulado após 1 hora de exposição a  $DL_{50}$ , (Tabela 2). Os demais agrotóxicos nas dosagens estudadas não provocaram alterações na expressão gênica do sistema antioxidante.

**TABELA 2:** Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL<sub>50</sub>) e subletal (DL<sub>50/100</sub>) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por ingestão pelo período de 1 hora de exposição.

| Ingestão 1h    |                  |     |                  |        |                  |        |                  |     |
|----------------|------------------|-----|------------------|--------|------------------|--------|------------------|-----|
| Genes          | Glifosato        |     | Imidaclopride    |        | Fipronil         |        | Piraclostrobina  |     |
|                | Dosagem e logFC  |     |                  |        |                  |        |                  |     |
|                | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub    | DL <sub>50</sub> | Sub    | DL <sub>50</sub> | Sub |
| <i>Sod1</i>    |                  |     |                  | + 1,60 | + 1,23           | + 1,51 |                  |     |
| <i>Sod2</i>    |                  |     |                  | + 1,68 | + 1,13           | + 1,51 |                  |     |
| <i>Rsod</i>    |                  |     |                  | + 2,20 | + 2,03           | + 1,83 |                  |     |
| <i>Cat</i>     |                  |     |                  | + 2,03 | + 1,60           | + 1,92 |                  |     |
| <i>Gtpx1</i>   |                  |     |                  |        | + 1,32           | + 1,18 |                  |     |
| <i>Gstmic1</i> |                  |     |                  | + 1,89 | + 1,83           | + 1,63 |                  |     |
| <i>Trxr1</i>   |                  |     |                  |        | + 1,56           | + 1,42 |                  |     |
| <i>Trx1</i>    |                  |     |                  |        |                  | + 2,30 |                  |     |
| <i>Trx2</i>    |                  |     |                  | + 1,94 | + 1,96           | + 1,55 |                  |     |
| <i>Trxgtx</i>  |                  |     |                  |        |                  | + 1,12 |                  |     |
| <i>Tpx6</i>    |                  |     |                  | + 1,93 | + 2,22           | + 2,28 |                  |     |
| <i>Grx2</i>    |                  |     |                  |        | - 1,36           |        |                  |     |

(+) = Upregulation; (-) = Downregulation. *Sod1* (Superoxide dismutase 1); *Sod2* (Superoxide dismutase 2); *Rsod* (LOC413369); *Cat* (Catalase); *Gtpx1* (Glutathione peroxidase-like 1); *Gstm1c1* (Microsomal glutathione S-transferase 1); *Trxr1* (Thioredoxin reductase 1); *Trx-1* (Thioredoxin, mitochondrial); *Trx-2* (Thioredoxin-2), *Trx/Gtx* (Glutaredoxin 3); *Tpx6* (Peroxiredoxin-6); *Grx2* (Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial).

Após o período de exposição de 4 horas ao alimento contaminado, a DL<sub>50</sub> do inseticida imidaclopride promoveu supraregulação de quatro genes do sistema antioxidante (Tabela 3). A DL<sub>50</sub> do herbicida glifosato promoveu a infraregulação de um gene e na dose subletal houve a infraregulação de dois genes do sistema antioxidante (Tabela 3). Para as demais doses testadas dos agrotóxicos não foram observadas alterações na expressão gênica.

**TABELA 3:** Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas, na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL<sub>50</sub>) e subletal (DL<sub>50/100</sub>) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por ingestão pelo período de 4 horas de exposição.

| Ingestão 4h    |                  |       |                  |     |                  |     |                  |     |
|----------------|------------------|-------|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|
| Genes          | Glifosato        |       | Imidaclopride    |     | Fipronil         |     | Piraclostrobina  |     |
|                | Dosagem e logFC  |       |                  |     |                  |     |                  |     |
|                | DL <sub>50</sub> | Sub   | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub |
| <i>Sod1</i>    |                  |       | + 1,49           |     |                  |     |                  |     |
| <i>Sod2</i>    |                  |       | + 2,31           |     |                  |     |                  |     |
| <i>Cat</i>     |                  |       | + 1,87           |     |                  |     |                  |     |
| <i>Tpx6</i>    |                  | -1,22 |                  |     |                  |     |                  |     |
| <i>Gstmic1</i> |                  | -1,32 | + 1,70           |     |                  |     |                  |     |
| <i>Trx1</i>    | -1,05            |       |                  |     |                  |     |                  |     |

(+) = Upregulation; (-) = Downregulation. *Sod1* (Superoxide dismutase 1); *Sod2* (Superoxide dismutase 2); *CAT* (Catalase); *Tpx6* (Peroxiredoxin-6); *Gstmic1* (Microsomal glutathione S-transferase 1); e *Trx-1* (Thioredoxin, mitochondrial).

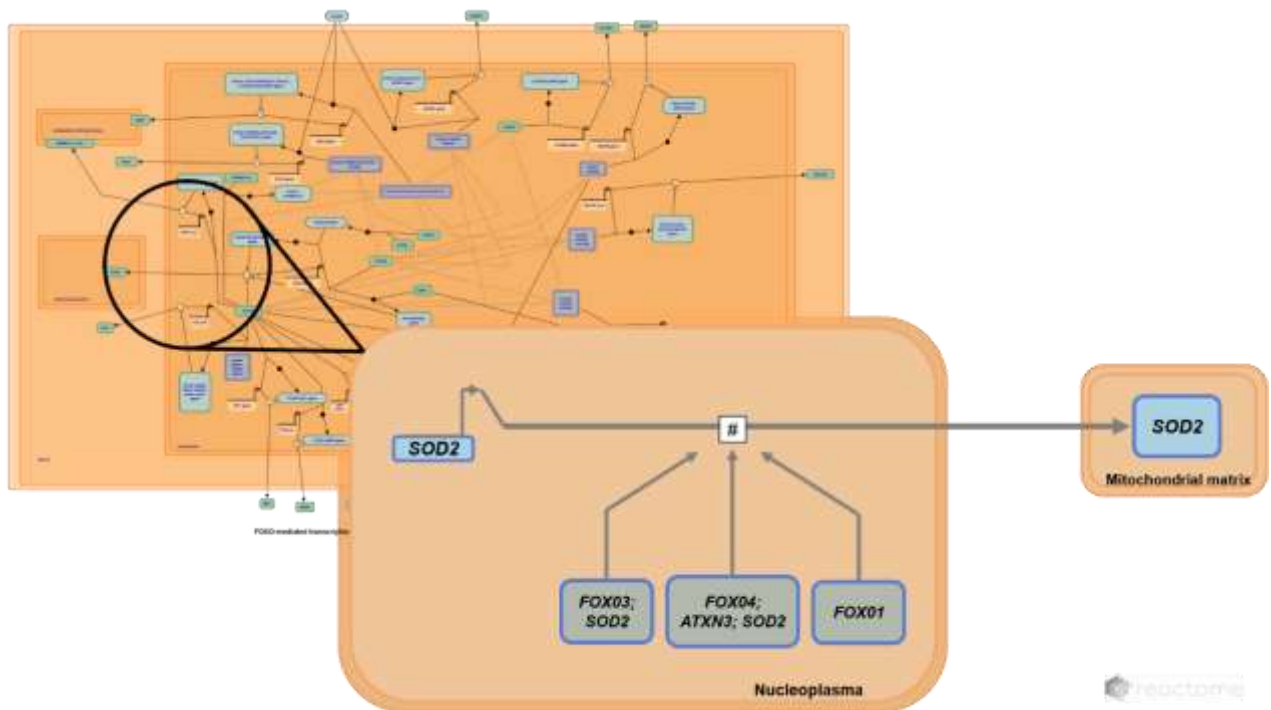
Para os testes de exposição por contato, observou-se alterações na expressão de genes apenas para o período de quatro horas (Tabela 4). A dose subletal do inseticida fipronil e do fungicida piraclostrobina promoveram a infraregulação de um gene cada (Tabela 4). O herbicida glifosato não alterou a expressão dos genes avaliados.

**TABELA 4:** Alterações na expressão de genes do sistema antioxidante em abelhas, na fase de campeiras contaminadas com a dose letal (DL<sub>50</sub>) e subletal (DL<sub>50/100</sub>) dos agrotóxicos (glifosato, imidaclopride, fipronil e piraclostrobina) por contato pelo período de 4 horas de exposição.

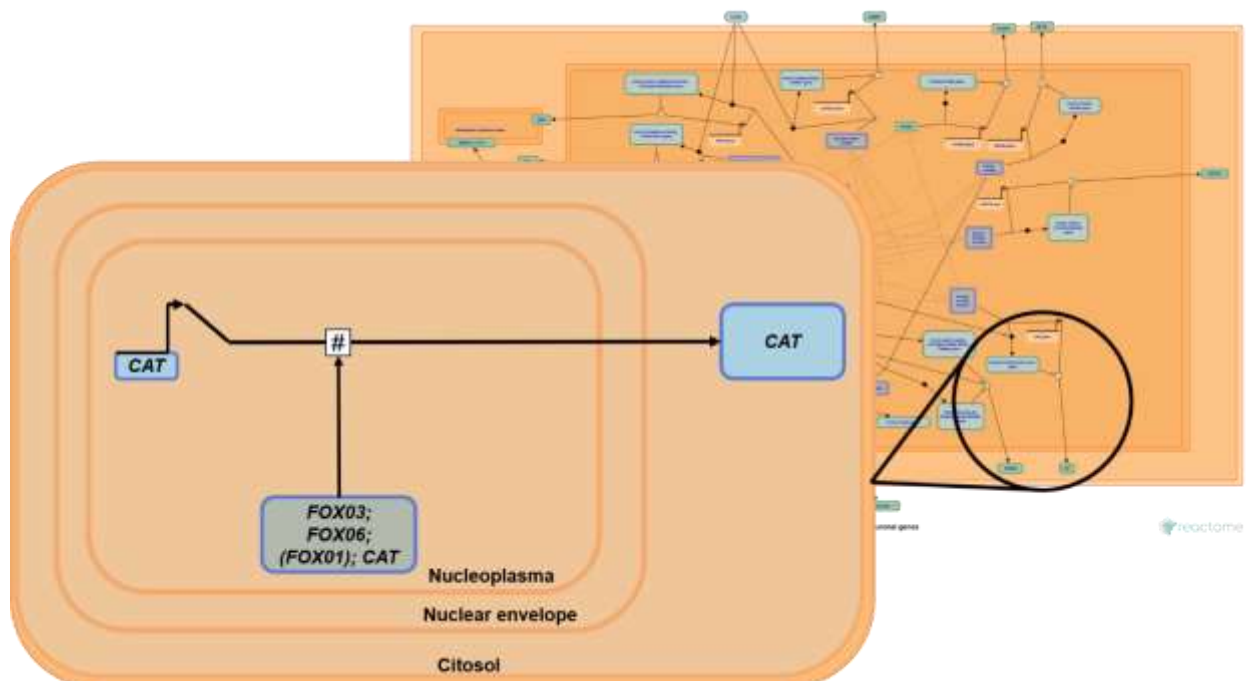
| Contato 4h   |                  |     |                  |     |                  |     |                  |     |
|--------------|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|
| Genes        | Glyphosate       |     | Imidacloprid     |     | Fipronil         |     | Pyraclostrobin   |     |
|              | Dosagem e logFC  |     |                  |     |                  |     |                  |     |
|              | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub | DL <sub>50</sub> | Sub |
| <i>GstD1</i> |                  |     |                  |     | -1,35            |     |                  |     |
| <i>GstZ1</i> |                  |     |                  |     |                  |     | -1,20            |     |

(+) = Upregulation; (-) = Downregulation.. *Gstmic1* (Glutathione S-transferase microsomal 1); *GstD1* (Glutathione S-transferase D1) e *GstZ1* (Probable maleylacetoacetate isomerase 2).

Para a obtenção da figura 1, os dados obtidos a partir do transcriptoma foram colocados no banco de dados do Rectome, afim de encontrar interações as genicas entre os genes estudados. Entre tanto foi possível identificar interações somente entre os genes *Sod2*, *Cat* e alguns genes da família *Fox*.



**Figura 1:** *FOXO3* estimula diretamente a transcrição do gene *SOD2* (superóxido dismutase dependente de manganês), codificando na matriz mitocondrial. Já a *FOXO4* e *ATXN3*, formam um complexo, que estimula diretamente a expressão da *SOD2*. Acetilação de *FOXO4* por *EP300* (*p300*) ou *CREBBP* (*CBP*) em resposta ao estresse oxidativo não afeta a indução da transcrição do gene *SOD2* mediada por *FOXO4*. E a *FOXO1* regula positivamente a transcrição de *SOD2*



**Figura 2:** A transcrição do gene *CAT* é diretamente estimulada pelo *FOXO3* e *FOXO6* que é regulando positivamente pela *FOXO1* embora a regulação direta pela *FOXO1* não tenha sido demonstrada.

## DISCUSSÃO

A preocupação com o impacto dos agrotóxicos na comunidade de polinizadores tem crescido, uma vez que diferentes formulações e ingredientes ativos causam efeitos adversos em organismos não-alvo, como as abelhas (POTTS *et al.*, 2010; GOULSON *et al.*, 2015), e podem promover aumento do estresse oxidativo, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TAWFIK *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2021; PALEOLOG *et al.*, 2021).

Neste estudo, verificou-se que a exposição das abelhas aos agrotóxicos fipronil e imidaclopride resultou em supregulação da glutatona (*GST*); este efeito observado sugere que o organismo da abelha procurou manter sua homeostase após a exposição aos inseticidas (HU *et al.*, 2019), na tentativa de minimizar os efeitos prejudiciais dos inseticidas (ZALUSKI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; ZALUSKI *et al.*, 2017; FARDER-GOMES *et al.*, 2021).

Por outro lado, observou-se infraregulação das *GST* quando as abelhas foram expostas ao glifosato, independentemente da dose utilizada, após 4 horas. Este resultado pode ser devido a dois fatores: a baixa toxicidade do glifosato as abelhas (JOHNSON 2015) ou possível esgotamento do sistema antioxidante pela exposição ao herbicida (ALMASRI *et al.*, 2020), o que poderia resultar em efeitos prejudiciais para as abelhas (ZHAO *et al.*, 2020).

Estes efeitos observados de modulação na expressão das *GST* pelos agrotóxicos observados são importantes, pois estas enzimas desempenham papel crucial na desintoxicação de compostos tóxicos eletrofílicos, como drogas, inseticidas e substâncias tóxicas endógenas em diversos organismos vivos (ENAYATI *et al.*, 2005), atuando no transporte intracelular, biossíntese de hormônios e proteção contra o estresse oxidativo (ARMSTRONG, 1997; ENAYATI *et al.*, 2005). Diferentes agrotóxicos podem regular a expressão dos genes *GST*, embora não estejam elucidados ainda os mecanismos que regulam esta indução.

Outra enzima importante do sistema antioxidante é a *superóxido dismutase (SOD)*, do grupo das metaloenzimas que combatem o estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio, eliminando radicais superóxidos (DE OBESO; SCHECKHUBER, 2022; FUJII *et al.*, 2022). A *SOD* está dentre as principais enzimas de ação antioxidantes nas abelhas, desempenhando papel crítico na diminuição do dano oxidativo causado por xenobióticos (incluindo inseticidas como fipronil e imidaclopride) (MARGOTTA *et al.*, 2018; FARDER-GOMES *et al.*, 2021), estressores ambientais como temperatura extrema, metais pesados, privação alimentar e patógenos (JIA *et al.*, 2014; NIKOLIĆ *et al.*, 2015; KOO *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017).

Neste estudo, houve suprarregulação das *SOD1* e *SOD2* após a exposição das abelhas aos inseticidas por ingestão em 1 hora e por contato em 4 horas. Novamente, pode-se inferir sobre a maior toxicidade do grupo dos inseticidas sobre as abelhas e a tentativa do organismo em equilibrar os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Em *Drosophila melanogaster* o aumento da atividade enzimática da *SOD* promove resistência ao estresse oxidativo e está intimamente associado ao aumento da expectativa de vida (SUN; TOWER, 1999).

A *catalase* (*CAT*) é encontrada principalmente em peroxissomos e mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015) e sua atividade ocorre em conjunto com altas concentrações de mitocôndrias em tecidos com elevadas taxas metabólicas, fornecendo proteção aos organismos (POWERS *et al.*, 1994). Neste estudo, observou-se que a *CAT* foi suprarregulada quando as abelhas foram expostas ao fipronil e imidaclopride por ingestão em 1 hora e pelo imidaclopride por ingestão no período de 4 horas. Estes resultados reforçam a hipótese da tentativa de equilíbrio do organismo contra os efeitos nocivos das ROS gerada pelos inseticidas (EVANS *et al.*, 2006; CORONA; ROBINSON, 2006).

Da mesma forma, os inseticidas fipronil e imidaclopride após 1 hora por ingestão promoveram suprarregulação das *peroxirredoxinas* (*TPX*), indicando resposta do sistema antioxidante aos xenobióticos (AKSAKAL, 2020). Por outro lado, 4 horas de exposição ao herbicida glifosato, as *TPX* foram infrarreguladas, sugerindo que o herbicida tem impacto adverso nas abelhas, prejudicando vias cruciais de desintoxicação e sinalização antioxidante (TAN *et al.*, 2022).

As *tioredoxinas* (*TRX*), produzidas nas mitocôndrias, são proteínas oxidoreductase altamente conservadas e essenciais para manter a homeostase redox celular (HOLMGREN *et al.*, 2005; CORONA; ROBINSON, 2006). Os resultados indicam suprarregulação das *TRX* e *Rsd* após 1 hora de exposição das abelhas aos inseticidas fipronil e imidaclopride por ingestão. ALBURAKI *et al.*, (2019) também observaram regulação positiva dos genes *tioredoxina* (*Trx-1*) e *Rsd* em abelhas confinadas e expostas a inseticidas por quatro semanas, em comparação com o grupo controle. O *Rsd* é um membro atípico da Cu/ZnSOD com um número notavelmente alto de íntrons (18) e um domínio SOD duplicado (ALBURAKI *et al.*, 2019). Genes homólogos foram identificados em *Apis*, protozoários e peixes, mas não foram encontrados em mamíferos (CORONA; ROBINSON, 2006). Por outro lado, em 4h de exposição ao herbicida glifosato via ingestão, a *TRX* foi infrarregulada, sugerindo o possível esgotamento do sistema antioxidante. Há vários estudos que mostram que glifosato tem vários efeitos na microbiota intestinal das abelhas, no comportamento de forrageamento, nos processos de desenvolvimento e nas vias antioxidantes (HELMER *et al.*, 2015; MOTTA *et al.*,

2018; VÁZQUEZ *et al.*, 2018; FARINA *et al.*, 2019), mostrando a complexidade e amplitude dos efeitos desse herbicida sobre as abelhas.

As *glutaredoxinas (Grx)* são uma glutathione-dissulfeto redutase geral de importância na regulação da homeostase redox celular; podem ser separadas em duas grandes subfamílias altamente abundantes, denominadas classe I e II Grx (WANG *et al.*, 2022). As superfamílias *Grx* e *Trx* mantêm ativamente a homeostase tiol-redox intracelular eliminando ROS (ADLURI *et al.*, 2012). A exposição das abelhas a dose subletal do agrotóxico fipronil, após 1 hora por ingestão promoveu a suprarregulação do gene *Trx-Gtx*; por outro lado, o gene *Grx2* foi infraregulado quando as abelhas foram expostas a dose letal do agrotóxico fipronil 1 hora por ingestão. As *Grx* são pequenas dissulfeto oxidoreduases estáveis ao calor, encontradas em procariotos e eucariotos, geralmente, possuem um sítio ativo altamente conservado, Cys-XX-Cys/Ser, e desempenham funções em diversos processos celulares, como metabolismo, polimerização de actina, transdução de sinal e transcrição de genes (YAO *et al.*, 2014). Atuam na eliminação de ROS, protegendo as células do dano induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando suprarreguladas (WU *et al.*, 2010), e quando infrareguladas apresentam efeito oposto, prejudicando o funcionamento do sistema antioxidante. A homeostase em abelhas individuais e colônias é assegurada por meio da atuação dos sistemas imunológico e antioxidante, que mitigam os efeitos negativos, provenientes de fatores externos (DZIECHCIARZ *et al.*; 2023), como a exposição aos agrotóxicos.

Observou-se que no período de 1 hora de exposição aos agrotóxicos, houve maior número de genes regulados quando comparado ao período de exposição de 4 horas, sugerindo possível tentativa do sistema antioxidante em manter a homeostase do organismo. Os resultados também mostram que as abelhas expostas a dose subletal dos agrotóxicos apresentaram maior número de genes do sistema antioxidantes regulados quando comparado a DL<sub>50</sub>, mostrando que mesmo em pequenas quantidades os agrotóxicos podem afetar de forma negativa as abelhas (ZALUSKI *et al.*, 2015), impactos negativos estes que podem prejudicar diversas vias metabólicas, afetando a memória (CHRISTEN *et al.*, 2016), aumentando a suscetibilidade a infecções (ALAUZ *et al.*, 2010), interferindo na reprodução (WILLIAMS *et al.*, 2015), no desenvolvimento (WU *et al.*, 2011), e como evidenciado neste trabalho no sistema antioxidante das abelhas *Apis mellíferas* africanizadas.

Os dados encontrados sugerem que a exposição das abelhas aos diferentes agrotóxicos, provavelmente foi capaz de modular a expressão de alguns genes da família Fox (*FOXO1*, *FOXO3*, *FOXO4* e *FOXO6*), documentado até o momento 16 genes pertencentes a esta família em abelhas *Apis mellifera* (NIE *et al.*, 2018). O gene *FoxP* foi identificado no cérebro das

abelhas operárias, sugerindo papel no desenvolvimento e maturação do cérebro das abelhas (NIE *et al.*, 2018). A ativação desse gene ocorre a partir de uma cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), uma via de sinalização de estresse oxidativo que pode ser ativada por vários estímulos, sendo responsável por regular a atividade dos fatores de transcrição da família Fox (KONDO *et al.*, 2005). Um dos fatores conhecidos, é a supra regulação do gene forkhead box responsável por iniciar a transcrição dos genes da família Fox (NIU *et al.*, 2023). Os genes da família Fox podem promover ou inibir a expressão de uma variedade de genes que podem regular a resposta ao estresse oxidativo e a longevidade do organismo (BRUNET *et al.*, 2004).

Neste cenário é possível sugerir que devido ao do estresse oxidativo promovido pelos agrotóxicos estudados, os genes *FOXO3* e *FOXO4*, e possivelmente *FOXO1*, estimularam diretamente a transcrição do gene *SOD2*, codificado na mitocôndria a superóxido dismutase dependente de manganês, é responsável pela conversão de superóxido hidrogênio e oxigênio (ARAUJO *et al.*, 2011; GUAN *et al.*, 2016). Entretanto, os genes *FOXO3* e *FOXO6*, e possivelmente *FOXO1*, estimulam diretamente a transcrição do gene *CAT*, codificando a catalase, uma enzima que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo assim as células do estresse oxidativo (SONG *et al.*, 2016; LIAO *et al.*, 2016). Assim, pode-se inferir que os agrotóxicos podem afetar os genes da família *FOX* e, indiretamente, promover alterações na expressão de genes do sistema antioxidante ativados por este grupo.

Os resultados apresentados mostram que a expressão gênica relacionada ao sistema antioxidante pode ser influenciada, por diferentes classes de agrotóxicos, indicando sua sensibilidade a essas substâncias. Sugere-se que os inseticidas promovem maiores danos as abelhas pela maior expressão de genes do sistema antioxidante, quando comparados aos herbicidas e fungicidas. Ademais, as análises de expressão gênica podem fornecer insights valiosos sobre como esses agrotóxicos podem impactar os processos de defesa antioxidante e, por extensão, a saúde geral das abelhas melíferas.

## REFERÊNCIAS

ADLURI, R.S.; THIRUNAVUKKARASU, M.; ZHAN, L.; DUNNA, N.R.; AKITA, Y.; SELVARAJU, V.; OTANI, H.; SANCHEZ, J. A.; HO, Y. S.; MAULIK, N. Glutaredoxin-1 overexpression enhances neovascularization and diminishes ventricular remodeling in chronic myocardial infarction. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e34790, 2012.

AKSAKAL, F. I. Evaluation of boscalid toxicity on *Daphnia magna* by using antioxidant enzyme activities, the expression of genes related to antioxidant and detoxification systems,

and life-history parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 237, p. 108830, 2020.

ALAUX, C.; BRUNET, J.L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; COUSIN, M.; BRILLARD, J.; BELZUNCES, L.P.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774-782, 2010.

ALBURAKI, M.; KARIM, S.; LAMOUR, K.; ADAMCZYK, J.; STEWART, S. D. RNA-seq reveals disruption of gene regulation when honey bees are caged and deprived of hive conditions. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 18, p. jeb207761, 2019.

AL-DALAEN, S. M.; AL-QTAITAT, A. I. Review article: oxidative stress versus antioxidants. **American Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 2, n. 5, p. 60-71, 2014.

ANDERSON, K.E.; SHEEHAN, T.H.; ECKHOLM, B.J.; MOTT, B.M.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v.58, p. 431– 444, 2011.

ALMASRI, H.; TAVARES, D.A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J-L.; BELZUNCES, L. P. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 203, p. 111013, 2020.

ARAUJO, J.; BREUER, P.; DIERINGER, S.; KRAUSS, S.; DORN, S.; ZIMMERMANN, K.; PFEIFER, A.; KLOCKGETHER, T.; EVERT, B. O. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 15, p. 2928-2941, 2011.

ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research In Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2-18, 1997.

ASTOLFI, A., KADRI, S. M., DE CASTRO LIPPI, I. C., MENDES, D. D., ALONSO, D. P., RIBOLLA, P. E. M., DE OLIVEIRA ORSI, R. Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 53, n. 6, p. 69, 2022.

BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v.58, p. 649-662, 2002.

BATISTA, A. C.; DOMINGUES, C. E. D. C.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 834-843, 2020.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v.57, n.1, p.289–300, 1995.

BLACQUIERE, T.; SMAGGHE, G.; VAN-GESTEL, C.A.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.21, n.4, p.973-992, 2012.

BLOT, N.; VEILLAT, L.; ROUZÉ, R.; DELATTE, H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PLoS One**: v.14, n.4, e0215466, 2019.

BOLOGNESI, C.; MERLO, F. D. Pesticides: Human Health Effects. iz: O. **Nriagu Jerome Encyclopedia of Environmental Health**. 2011.

BOU-ABDALLAH, F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1800, n. 8, p. 719-731, 2010.

BOVI, T.S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R.O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.1, p.239-245, 2018.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 7-8, p. 466-472, 2010.

BRUNET, A.; SWEENEY, L. B.; COHEN, H. Y.; HU, L. S.; CHENG, H. L.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; GYGI, S. P.; SINCLAIR, D. A.; ALTE, F. W.; GREENBERG, M. E. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. **science**, v. 303, n. 5666, p. 2011-2015, 2004.

CALIANI, I.; CAMPANI, T.; CONTI, B.; COSCI, F.; BEDINI, S.; D'AGOSTINO, A.; AMMENDOLA, A.; DI NOI, A.; GORI, A.; CASINI, S. Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111486, 2021.

CAMILLI, M. P.; KADRI, S. M.; ALVAREZ, M. V. N.; RIBOLLA, P. E. M.; ORSI, R. O. Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 282, 2022.

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

CERVONI, M.S.; CARDOSO-JÚNIOR, C.A.; CRAVEIRO, G., SOUZA, A.D.O.; ALBERICI, L.C.; HARTFELDER, K. Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Journal of Experimental Biology**, v.220, p.4035-4046, 2017.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 1993.

CHRISTEN, V.; FENT, K. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. **Environmental Pollution**, v.226, p.48-59, 2017.

CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, v.50, n.7, p.4071-4081, 2016.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1337-1348, 2007.

CORONA, M.; ROBINSON, G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 687-701, 2006.

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

DE BARROS, D. C.; CAMILLI, M. P.; MARTINELI, G. M.; LONGUINI, A. A.; KADRI, S. M.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. O. Effect of organic and inorganic zinc supplementation on the development of mandibular glands in *Apis mellifera*. **Bulletin of Insectology**, v. 74, n. 2, p. 209-12, 2021.

DE OBESO F. D. V. A.; SCHECKHUBER, C. Q. Superoxide dismutases in eukaryotic microorganisms: four case studies. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 188, 2022.

DZIECHCIARZ, P.; STRACHECKA, A.; BORSUK, G.; OLSZEWSKI, K. Effect of rearing in small-cell combs on activities of catalase and superoxide dismutase and total antioxidant capacity in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 709, 2023.

ELSTON, C.; THOMPSON, H.M.; WALTERS, K. F. Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. **Apidologie**, v.44, n.5, p.563-574, 2013.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.

EVANS, J. D.; ARONSTEIN, K.; CHEN, Y. P.; HETRU, C.; IMLER, J. L.; JIANG, H.; KANOST, M.; THOMPSON, G. J.; ZOU, Z.; HULTMARK, D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 645-656, 2006.

FARDER-GOMES, C. F.; FERNANDES, K. M.; BERNARDES, R. C.; BASTOS, D. S. S.; MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of The Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.

FARINA, W. M.; BALBUENA, M. S.; HERBERT, L. T.; MENGONI GOÑALONS, C.; VÁZQUEZ, D. E. Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. **Insects**, v. 10, n. 10, p. 354, 2019.

FABREGAT, A.; JUPE, S.; MATTHEWS, L.; SIDIROPOULOS, K.; GILLESPIE, M.; GARAPATI, P.; HAW, R.; JASSAL, B.; KORNINGER, F.; MAY, B.; MILACIC, M.; ROCA, C. D.; ROTHFELS, K.; SEVILLA, C.; SHAMOVSKY, V.; SHORSER, S.; VARUSAI, T.;

VITERI, G.; WEISER, J.; WU, G.; STEIN, L.; HERMJAKOB, H.; D'EUSTACHIO, P. The reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D649-D655, 2018.

FINE, J.D.; COX-FOSTER, D.L.; MULLIN, C.A. An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. **Scientific Reports**, v.7, p.1–9, 2017.

FUJII, J.; HOMMA, T.; OSAKI, T. Superoxide radicals in the execution of cell death. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 501, 2022.

GLAVINIC, U.; TESOVIĆ, T.; STEVANOVIĆ, J.; ZORC, M.; CIZELJ, I.; STANIMIROVIĆ, Z.; NARAT, M. Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. **PeerJ**, v. 7, p. e6325, 2019.

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

GUAN, X. H.; LIU, X. H.; HONG, X.; ZHAO, N.; XIAO, Y. F.; WANG, L. F.; TANG, L.; JIANG, K.; QIAN, Y.S.; DENG, K.Y.; JI, G.; FU, M.; XIN, H. B. CD38 deficiency protects the heart from ischemia/reperfusion injury through activating SIRT1/FOXOs-mediated antioxidative stress pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

GUPTA, D.; CHAUHAN, H.; GUPTA, S.; GUPTA, R. Effect of Colony Collapse Disorder on Honeybees. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**, v.16, n.10, p.4149-4152, 2019.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HE, B.; LIU, Z.; WANG, Y.; CHENG, L.; QING, Q.; DUAN, J.; XU, J.; DANG, X.; ZHOU, Z.; LI, Z. Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 228, p. 112709, 2021.

HELMER, S. H.; KERBAOL, A.; ARAS, P.; JUMARIE, C.; BOILY, M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8010-8021, 2015.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.-F.; AUPINEL, P. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v.336, p.348–350, 2012.

HOLMGREN, A.; JOHANSSON, C.; BERNDT, C.; LÖNN, M. E.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 6, p. 1375-1377, 2005.

HU, B.; HU, S.; HUANG, H.; WEI, Q.; REN, M.; HUANG, S.; TIAN, X.; SU, J. Insecticides induce the co-expression of glutathione S-transferases through ROS/CncC pathway in *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 58-71, 2019.

JASSAL, B.; MATTHEWS, L.; VITERI, G.; GONG, C.; LORENTE, P.; FABREGAT, A.; SIDIROPOULOS, K.; COOK, J.; GILLESPIE, M.; HAW, R.; LONEY, F.; MAY, B.; MILACIC, M.; ROTHFELS, K.; SEVILLA, C.; SHAMOVSKY, V.; SHORSER, S.; VARUSAI, T.; WEISER, JOEL.; WU, G.; STEIN, L.; HERMJAKOB, H.; D'EUSTACHIO, P. The reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D498-D503, 2020.

JIA, H.; SUN, R.; SHI, W.; YAN, Y.; LI, H.; GUO, X.; XU, B. Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative stress. **Journal of insect physiology**, v. 60, p. 68-79, 2014.

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

KAIRO, G.; BIRON, D. G.; BEN ABDELKADER, F.; BONNET, M.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; DUSSAUBAT, C.; BENOIT, B.; KRETZSCHMAR, A.; BELZUNCES, L. P.; BRUNET, J. L. Nosema ceranae, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

KASHIWAQUI, M.M.; GUERREIRO, J.C. Inseticidas antagonistas do GABA: Potencialidades e riscos para o manejo integrado de pragas. **Journal of Agronomic Sciences**, v.4, p.186-200, 2015.

KONDO, M.; YANASE, S.; ISHII, T.; HARTMAN, P. S.; MATSUMOTO, K.; ISHII, N. The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. **Mechanisms Of Ageing And Development**, v. 126, n. 6-7, p. 642-647, 2005.

KOO, H. N.; LEE, S. G.; YUN, S. H.; KIM, H. K.; CHOI, Y. S.; KIM, G. H. Comparative analyses of Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) and thioredoxin reductase (TrxR) at the mRNA level between *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. (Hymenoptera: Apidae) under stress conditions. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 4, 2016.

KRAMER, B. H.; NEHRING, V.; BUTTSTEDT, A.; HEINZE, J.; KORB, J.; LIBBRECHT, R.; MEUSEMANN, K.; PAXTON, R. J.; SCHAUBE, A.; SCHAUBE, F.; BERNADOU, A. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1823, p. 20190732, 2021.

LESKA, A.; NOWAK, A.; NOWAK, I.; GÓRCZYŃSKA, A. Effects of insecticides and microbiological contaminants on *Apis mellifera* health. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5080, 2021.

LI, Z.; HOU, M.; QIU, Y.; ZHAO, B.; NIE, H.; SU, S. Changes in antioxidant enzymes activity and metabolomic profiles in the guts of honey bee (*Apis mellifera*) larvae infected with *Ascosphaera apis*. **Insects**, v. 11, n. 7, p. 419, 2020.

LIAO, L.; SU, X.; YANG, X.; HU, C.; LI, B.; LV, Y.; SHUAI, Y.; JING, H.; DENG, Z.; JIN, Y. TNF- $\alpha$  inhibits FoxO1 by upregulating miR-705 to aggravate oxidative damage in bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteoporosis. **Stem Cells**, v. 34, n. 4, p. 1054-1067, 2016.

MARGOTTA, J.; ROBERTS, S.; ELEKONICH, M. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, v.221, p.1- 12, 2018.

MOTTA, E. V. S; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305-10310, 2018.

MOTTA, E.V.S.; MORAN, N.A. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. **mSystems**: v.5, n.4, e00268-20, 2020.

NIE, H.; GENG, H.; LIN, Y.; XU, S.; LI, Z.; ZHAO, Y.; SU, S. Genome-Wide Identification and Characterization of Fox Genes in the Honeybee, *Apis cerana*, and Comparative Analysis with Other Bee Fox Genes. **International Journal of Genomics**, v. 2018, 2018.

NIKOLIĆ, T. V.; PURAĆ, J.; ORČIĆ, S.; KOJIĆ, D.; VUJANOVIĆ, D.; STANIMIROVIĆ, Z.; GRŽETIĆ, I.; ILJEVIĆ, K.; ŠIKOPARIJA, B.; BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, v. 90, n. 4, p. 181-194, 2015.

NIU, X. J.; SUN, Y. H.; WANG, L. J.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y.; GUO, X. Q.; XU, B. H.; WANG, C. Fox transcription factor AccGRF1 in response to glyphosate stress in *Apis cerana cerana*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 192, p. 105419, 2023.

O'NEAL, T. S.; ANDERSON, T. D.; WU-SMART, J. Y. Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. **Current Opinion In Insect Science**, v. 26, p. 57-62, 2018.

PALEOLOG, J.; WILDE, J.; MISZCZAK, A.; GANCARZ, M.; STRACHECKA, A. Antioxidation defenses of *Apis mellifera* queens and workers respond to imidacloprid in different age-dependent ways: Old queens are resistant, foragers are not. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1246, 2021.

PISA, L.W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P.; BONMATIN, J.M.; DOWNS, C.A.; GOULSON, D.; MORRISSEY, C.A. Effects of neonicotinoids and fipronil on non- target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.1, p.68-102, 2015.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends In Ecology & Evolution**, V. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

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

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J., II, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 2, p. R375-R380, 1994.

RAIMETS, R.; BONTŠUTŠNAJA, A.; BARTKEVICS, V.; PUGAJEVA, I.; KAART, T.; PUUSEPP, L.; PIHLIK, P.; KERES, I.; VIINALASS, H.; MÄND, M.; KARISE, R. Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere**, v. 238, p. 124555, 2020.

SELMAN, C.; BLOUNT, J.D.; NUSSEY, D.H.; SPEAKMAN, J.R. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? **Trends In Ecology & Evolution**, v. 27, n. 10, p. 570-577, 2012.

SHI, T. F.; WANG, Y. F.; LIU, F.; QI, L.; YU, L. S. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal Of Economic Entomology**, v. 110, n. 6, p. 2283-2289, 2017.

SILVA, V., MOL, H. G., ZOMER, P., TIENSTRA, M., RITSEMA, C. J., & GEISSEN, V. Pesticide residues in European agricultural soils—A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532-1545, 2019.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P.; BONMATIN, J.M.; CHAGNON, M., DOWNS, C.; GOULSON, D. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.1, p.5-34, 2015.

SONG, C.; PENG, W.; YIN, S.; ZHAO, J.; FU, B.; ZHANG, J.; MAO, T.; WU, H.; ZHANG, Y. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35165, 2016.

STEINHAUER, N.; KULHANEK, K.; ANTÚNEZ, K.; HUMAN, H.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHAUZAT, M. P. Drivers of colony losses. **Current Opinion In Insect Science**, v. 26, p. 142-148, 2018.

STRACHECKA, A.; ŁOŚ, A.; FILIPCZUK, J.; SCHULZ, M. Individual and social immune mechanisms of the honey bee. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 74, n. 7, p. 426-433, 2018.

SUN, J.; TOWER, J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. **Molecular And Cellular Biology**, 1999.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E.; MALAQUIAS, J. B.; CAMILO, E. V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3277, 2019.

TAN, S.; LI, G.; LIU, Z.; WANG, H.; GUO, X.; XU, B. Effects of glyphosate exposure on honeybees. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 90, p. 103792, 2022.

TAWFIK, A. I.; AHMED, Z. H.; ABDEL-RAHMAN, M. F.; MOUSTAFA, A. M. Influence of winter feeding on colony development and the antioxidant system of the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 752-763, 2020.

THOMPSON, H.M.; HUNT, L.V. Extrapolating from Honeybees to Bumblebees in Pesticide Risk Assessment. **Ecotoxicology**: v.8, p.147-166, 1999.

VÁZQUEZ, D. E.; ILINA, N.; PAGANO, E. A.; ZAVALA, J. A.; FARINA, W. M. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. **PloS One**, v. 13, n. 10, p. e0205074, 2018.

VÁZQUEZ, D.E.; BALBUENA, M.S.; CHAVES, F.; GORA, J.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. **Scientific Reports**: v.10, 2020a.

VÁZQUEZ, D.E.; LATORRE-ESTIVALIS, J.M.; ONS, S.; FARINA, W.M. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**, v.261, 2020b.

WANG, X.; MARTÍNEZ, M. A.; WU, Q.; ARES, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A.; YUAN, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews In Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 876-899, 2016.

WANG, Y.; WANG, Q.; HOU, Y.; LIU, J. Glutaredoxin Interacts with GR and AhpC to Enhance Low-Temperature Tolerance of Antarctic Psychrophile Psychrobacter sp. ANT206. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1313, 2022.

WILLIAMS, G. R.; TROXLER, A.; RETSCHNIG, G.; ROTH, K.; YAÑEZ, O.; SHUTLER, D.; NEUMANN, P.; GAUTHIER, L. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14621, 2015.

WU, H.; XING, K.; LOU, M. F. Glutaredoxin 2 prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1797, n. 10, p. 1705-1715, 2010.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e14720, 2011.

WU, H.; ZHANG, Y.; SHI, X.; ZHANG, J.; MA, E. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in *Oxya chinensis* mediates increased malathion tolerance. **Chemosphere**, v. 181, p. 352-359, 2017.

YAO, P.; CHEN, X.; YAN, Y.; LIU, F.; ZHANG, Y.; GUO, X.; XU, B. Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 335-346, 2014.

ZALUSKI, R.; KADRI, S.M.; ALONSO, D.P.; ROBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 34, No. 5, pp. 1062–1069, 2015.

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

ZHANG, B.; XU, Z.; ZHANG, Y.; SHAO, X.; XU, X.; CHENG, J.; LI, Z. Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 119, p. 81-89, 2015.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 3ed Edition, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River. 1996.

ZHAO, H.; LI, G.; GUO, D.; WANG, Y.; LIU, Q.; GAO, Z.; WHANG, H.; LIU, Z.; GUO, X.; XU, B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140819, 2020.

## CAPÍTULO 4

---

## IMPLICAÇÕES

A presente pesquisa revela importantes implicações tanto para a teoria quanto para a prática no campo da apicultura. A utilização de agrotóxicos representa uma ameaça significativa para as abelhas *Apis mellifera*. Esses produtos químicos podem afetar negativamente o equilíbrio redox das células, causando estresse oxidativo ao aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio. Isso pode comprometer as enzimas antioxidantes essenciais, como a *superóxido dismutase (SOD)*, *catalase (CAT)* e *glutathione-S-transferase (GST)*, que desempenham um papel essencial na defesa antioxidante das abelhas.

Os agrotóxicos, podem impactar diretamente a atividade dessas enzimas, levando a disfunções no sistema antioxidante das abelhas e resultando em consequências negativas para sua saúde, incluindo danos ao sistema imunológico, distúrbios no desenvolvimento, problemas reprodutivos, diminuição da população de abelhas além de prejuízos fisiológicos e comportamentais.

A pesquisa destaca a necessidade de revisar e regular o uso de agrotóxicos na agricultura. As evidências sugerem que práticas agrícolas mais sustentáveis e a implementação de políticas públicas que promovam a proteção das abelhas são essenciais. Medidas práticas podem incluir:

- **Desenvolvimento e uso de agrotóxicos menos tóxicos para as abelhas;**
- **Adoção de técnicas de manejo integrado de pragas (MIP) que reduzam a necessidade de agrotóxicos;**
- **Estabelecimento de zonas de proteção onde o uso de agrotóxicos é restrito ou proibido;**
- **Uso correto dos agrotóxicos nos cultivos agrícolas, de acordo com a recomendação da bula;**
- **Desenvolvimento de políticas públicas em prol da preservação das abelhas.**

Essas ações podem ajudar a mitigar os efeitos negativos dos agrotóxicos, protegendo as abelhas melíferas e, por extensão, a segurança alimentar global, dado o papel fundamental das abelhas na polinização.

A pesquisa abre novas questões e áreas para investigação futura, tais como:

- **Exposição das abelhas por via contato aos efeitos de agrotóxicos no sistema imune das abelhas.**

- **Estudos de longo prazo sobre as consequências subletais da exposição crônica aos agrotóxicos.**
- **Investigação das interações entre múltiplos estressores ambientais, como patógenos e agrotóxicos, no sistema imunológico e no sistema antioxidante das abelhas.**
- **Efeito da cera contaminada na sobrevivência de abelhas *Apis mellifera*.**
- **Efeito do aquecimento global + agrotóxicos no desenvolvimento de abelhas melífera.**

Essas direções podem fornecer uma compreensão mais completa dos riscos ambientais e ajudar no desenvolvimento de estratégias de mitigação mais eficazes.

As implicações deste estudo variam conforme o contexto geográfico e agrícola. Em regiões com alta dependência de culturas polinizadas por abelhas, os resultados ressaltam a necessidade de uma gestão rigorosa do uso de agrotóxicos. Além disso, a conscientização pública e a educação dos agricultores sobre práticas agrícolas sustentáveis são essenciais para garantir a saúde das populações de abelhas e a continuidade dos serviços de polinização.

A compreensão dessas implicações é essencial, pois as abelhas desempenham um papel fundamental na polinização de plantas, sendo vitais para a produção de alimentos. Portanto, a utilização responsável de agrotóxicos e a implementação de práticas agrícolas mais sustentáveis e políticas públicas, são essenciais para proteger não apenas as abelhas, mas também a segurança alimentar global.