

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS E DA
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM ABELHAS SEM
FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona postica***

Cássia Regina de Avelar Gomes

Mestre em Zootecnia

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS E DA
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM ABELHAS SEM
FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona postica***

Discente: Me. Cássia Regina de Avelar Gomes

Orientador: Prof. Dr. Daniel Nicodemo

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal.**

G633a

Gomes, Cassia Regina de Avelar

Avaliação da exposição a fungicidas e da suplementação alimentar em abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica* / Cassia Regina de Avelar Gomes. -- Jaboticabal, 2025

131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Nicodemo

1. Meliponicultura. 2. Metabolismo energético. 3. Nutrição animal.
4. Agrotóxicos. 5. Pulverização controlada. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Abelhas são vitais para a agricultura e ecossistemas, mas agrotóxicos as prejudicam mesmo com suplementação alimentar. Nosso estudo mostra que fungicidas considerados seguros afetam a respiração celular das abelhas mandaguari. Alertando para necessidade de regulamentação precisa e práticas agrícolas sustentáveis que protejam polinizadores cruciais para segurança alimentar global.

Potential impact of this research

Bees are vital for agriculture and ecosystems, but agrotoxics harm them even with nutritional supplements. Our study shows that fungicides considered safe impair cellular respiration in mandaguari bees. This highlights the urgent need for precise regulations and sustainable farming practices to protect these crucial pollinators for global food security.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS E DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM ABELHAS SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona postica*

AUTORA: CÁSSIA REGINA DE AVELAR GOMES

ORIENTADOR: DANIEL NICODEMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal, área: Fisiologia e Bem Estar Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL NICODEMO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL NICODEMO**
Data: 26/02/2025 15:11:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Araras/SP

Documento assinado digitalmente
 **ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI**
Data: 27/02/2025 14:15:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Associado RICARDO DE OLIVEIRA ORSI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO DE OLIVEIRA ORSI**
Data: 13/03/2025 21:11:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **DAVID DE JONG**
Data: 13/03/2025 17:47:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente

FABIO ERMINIO MINGATTO

Data: 13/03/2025 17:01:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2025

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CÁSSIA REGINA DE AVELAR GOMES - Nascida em Presidente Prudente, São Paulo, em 18 de julho de 1976, Cássia iniciou sua trajetória acadêmica em 1994, ao ingressar no curso de Zootecnia na Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista, concluído em 1998. Em 2001, obteve o título de mestre em Zootecnia pela UNESP de Ilha Solteira, com uma dissertação sobre a seleção de touros da raça Guzerá, e começou sua carreira como professora universitária na Fundação Educacional de Andradina. No ano seguinte, foi contratada pelo Centro Universitário de Adamantina, onde lecionou para os cursos de Medicina Veterinária e Nutrição, desenvolvendo também habilidades em gestão educacional. Desde 2014, atua como professora e coordenadora de estágios nos cursos de Agronomia, Medicina Veterinária e Serviço Social na Fundação Educacional de Andradina. Em 2020, concluiu Licenciatura em Pedagogia pela Universidade Anhanguera - Uniderp, ampliando sua atuação na área educacional. Atualmente, cursa doutorado em Ciência Animal na UNESP de Jaboticabal, com pesquisas voltadas à meliponicultura e educação ambiental. Proprietária do Meliponário da Cássia, dedica-se à meliponicultura urbana, promovendo práticas sustentáveis e educação ambiental.

*"Eu sou aquela mulher que fez a
escalada da montanha da vida,
removendo pedras e plantando flores."*

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus, fonte inesgotável de fé e coragem, cuja presença iluminou cada passo desta caminhada. À minha mãe, Márcia Regina da Silveira Santos (*in memoriam*), que sempre me apoiou incondicionalmente, acreditou em meu potencial e sempre teve muito orgulho. Ao meu pai, Hamilton de Avelar Gomes, cuja cobrança por responsabilidade me motivou a ir além, na esperança de lhe dar orgulho. E aos meus filhos, Mariana Avelar Gomes Silva, Gustavo Henrique Avelar Gomes Silva e Maria Eduarda Avelar Gomes Silva, razão maior de cada conquista, e por quem todos os esforços verdadeiramente valem a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, com todo o meu coração, ao meu marido, Ricardo Jatobá da Silva, e aos meus filhos, Mariana Avelar Gomes Silva, Gustavo Henrique Avelar Gomes Silva e Maria Eduarda Avelar Gomes Silva, por nunca hesitarem em apoiar e incentivar cada etapa deste projeto, compartilhando comigo cada conquista e cada dificuldade. Agradeço ao meu amigo Hussein Jaruche Neto, que sempre me estende a mão e me apresentou às abelhas sem ferrão, ampliando meus horizontes e despertando uma nova paixão.

À minha irmã de coração, Tania Mara Haddad Machado, pela prontidão em ajudar, sem medir esforços, em tudo o que preciso. À minha irmã gêmea, Flavia Regina de Avelar Gomes, por estar sempre ao meu lado, ajudando, e aos seus filhos, Gabriela Avelar Gomes Pereira e Hugo Avelar Gomes Pereira, por me emprestarem a mãe com tanto carinho e por demonstrarem orgulho de mim como tia. À minha irmã Andrea Avelar Gomes Pereira, por suas críticas construtivas, por enxergar leveza onde eu via peso e por me lembrar que o caminho pode ser mais suave.

Aos meus amigos, por sua amizade sincera e incentivo contínuo, me fazendo sentir capaz e apoiada. Aos colegas de pós-graduação — Taina Angélica de Lima, Matheus Franco Trivellato e Yara Martins Ferraz — que, dividindo as mesmas angústias e alegrias, tornaram esta jornada mais leve e menos solitária. De maneira especial, à Camila Araújo, cuja paciência, habilidade e generosidade em ensinar as análises de laboratório foram fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

Ao meu orientador, Daniel Nicodemo, que acreditou em mim quando nem eu acreditava tanto, e que hoje tenho a felicidade de chamar de amigo. E, é claro, a todos os meus familiares e alunos, que, com seus sorrisos, incentivos e torcida, me encorajam diariamente a seguir adiante, a não desistir e a lembrar do porquê de tudo isso. Vocês são parte viva desta conquista.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1.1 Introdução	03
1.2 Abelhas nativas no Brasil	04
1.3 Aspectos gerais da biologia da abelha <i>Scaptotrigona postica</i>	05
1.4 Exposição a agrotóxicos e seus efeitos nas abelhas	07
1.4.1 Fungicida Bixafem	09
1.4.2 Fungicida Protioconazol	11
1.4.3 Fungicida Trifloxistrobina	12
1.5. Interação entre exposição a agrotóxicos e restrição alimentar em abelhas	13
Referências	15
 CAPÍTULO 2 – EXPOSIÇÃO POR CONTATO DE ABELHAS SOCIAIS SEM FERRÃO A FUNGICIDAS PULVERIZADOS EM ALGODÃO E SOJA EM UM SISTEMA DE SIMULAÇÃO DE CAMPO CONTROLADO	 24
2.1 Introdução	26
2.2 Material e Métodos	28
2.2.1 Localização da pesquisa e cultivo do algodão e soja	28
2.2.2 Aplicação da solução de fungicida nas plantas e abelhas em um ambiente controlado	28
2.2.3 Coleta de abelhas após a pulverização e determinação dos níveis de exposição por meio do contato com os três princípios ativos do fungicida em avaliação	31
2.2.4 Análises estatísticas	33
2.3 Resultados	33
2.3.1 Avaliação dos princípios ativos na solução do fungicida e contaminação das abelhas no grupo de controle	33
2.3.2 Contaminação de abelhas sem ferrão em plantas de soja	34
2.3.3 Contaminação de abelhas sem ferrão em plantas de algodão	34
2.4 Discussão	35

2.5 Conclusão	40
Referências	40
CAPÍTULO 3 – PREFERÊNCIA E INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA NO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE ABELHAS <i>Scaptotrigona postica</i>	
3.1 Introdução	46
3.2 Material e Métodos	48
3.2.1 Local do experimento e colônias de abelhas	48
3.2.2 Preparação do suplemento proteico e avaliação da preferencia para abelha <i>Scaptotrigona postica</i>	49
3.2.3 Avaliação do desempenho das colônias de <i>Scaptotrigona postica</i>	52
3.2.4 Análises estatísticas	55
3.3 Resultados	55
3.3.1 Preferência por suplementos nutricionais com diferentes ingredientes em colônias de abelhas mandaguari	55
3.3.2 Desempenho das colônias de <i>Scaptotrigona postica</i> que receberam ou não suplementação proteica	56
3.4 Discussão	58
3.4.1 Preferencia por suplementos proteicos da abelha mandaguari	58
3.4.2 Comparação do desenvolvimento de colônias de abelhas mandaguari que receberam ou não os suplementados nutricionais	60
3.5 Conclusão	61
Referências	62
CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE ABELHAS <i>Scaptotrigona postica</i> expostas à fungicida de ação tripla	
4.1 Introdução	67
4.2 Material e Métodos	69
4.2.1 Local de reação das pesquisas e manejo das colônias de abelhas nativas	69
4.2.2 Substâncias químicas e dosagens	70

4.2.3 Obtenção do homogenato do tórax de abelhas e dosagem de proteína	70
4.2.4 Avaliação da bioenergética mitocondrial “in vitro” e “in vivo”	71
4.2.5 Quantificação da concentração de ATP por quimioluminescência em tórax de abelhas	72
4.2.6 Análises estatísticas	73
4.3 Resultados	74
4.3.1 Efeito do nixafem, protioconazol, trifloxistrobina e sua combinação na respiração mitocondrial “in vitro”	74
4.3.2 Efeito do bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e a combinação dos três p. a. na respiração mitocondrial “in vivo”	78
4.3.3 Efeito do bixafem, protioconazol, tribloxistrobina e sua combinação na concentração de ATP mitocondrial	81
4.4 Discussão	83
4.4.1 Efeito dos princípios ativos e sua combinação na respiração mitocondrial “in vitro”	83
4.4.2 Efeito dos princípios ativos e sua combinação na respiração mitocondrial “in vivo”	85
4.4.3 Efeito dos princípios ativos e sua combinação na concentração de ATP	87
4.5 Conclusão	88
Referências	89

CAPÍTULO 5 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE EM ABELHAS <i>Scaptotrigona postica</i> EXPOSTAS A FUNGICIDAS	93
5.1 Introdução	95
5.2 Material e Métodos	96
5.2.1 Local do experimento e manejo alimentar das colônias de abelhas	96
5.2.2 Exposição tópica aos fungicidas e condições experimentais	97
5.2.3 Obtenção do homogenato do tórax das abelhas mandaguari	98
5.2.4 Concentração de oxidantes enzimáticos	99

5.2.4.1 Determinação da atividade de glutathione peroxidase (GPx)	99
5.2.4.2 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)	99
5.2.5 Concentração de oxidantes não enzimáticos	99
5.2.5.1 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH)	99
5.2.5.2 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	100
5.2.6 Danos oxidativos	100
5.2.6.1 Avaliação da lipoperoxidação	100
5.2.6.2 Oxidação de grupos tióis de proteínas	101
5.2.7 Análises estatísticas	101
5.3 Resultados	100
5.3.1 Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)	100
5.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT)	103
5.3.3 Concentração de glutathione reduzida (GSH)	104
5.3.4 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	106
5.3.5 Avaliação da lipoperoxidação	107
5.3.6 Avaliação da oxidação de grupos tióis de proteínas	109
5.4 Discussão	110
5.5 Conclusão	113
Referência	113

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS E DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM ABELHAS SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *Scaptotrigona postica*

RESUMO - A preservação dos ecossistemas e a produtividade agrícola dependem da polinização entomófila, a qual tem sido impactada por práticas agrícolas intensivas, inclusive o uso de agrotóxicos. Embora os fungicidas sejam considerados menos prejudiciais que os inseticidas, eles podem causar efeitos adversos à saúde das abelhas, especialmente em condições de escassez alimentar. Este estudo avaliou os efeitos metabólicos da exposição de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* aos princípios ativos bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina, componentes de um fungicida comercial, em doses de 0,7 e 2,7 µg por abelha, isolados ou em combinação. Ensaio controlados de exposição a fungicidas foram conduzidos em câmara laboratorial equipada com sistema de pulverização automatizado sobre esteiras móveis, projetado para replicar com precisão as condições de aplicação em campo, revelaram maior exposição em abelhas posicionadas no topo das plantas e expostas a gotículas finas. Em uma segunda etapa, comparou-se o efeito desses compostos em abelhas de colônias com e sem suplementação alimentar fermentada. A suplementação alimentar foi investigada como estratégia de mitigação aos efeitos dos fungicidas, utilizando dietas proteicas que foram misturadas e fermentadas por sete dias, que continham levedo de cerveja, proteína isolada de soja, açúcar, leite de soja e pão das abelhas. Após 13 semanas de suplementação, foi observado maior peso corporal em abelhas de colônias suplementadas em relação ao controle, indicando benefícios nutricionais, mesmo sem aumento significativo no estoque de alimentos das colônias. No entanto, os efeitos prejudiciais dos fungicidas foram observados em abelhas de ambos os grupos. Houve comprometimento da respiração mitocondrial, evidenciado pela redução do consumo de oxigênio nos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons e diminuição nos níveis de ATP. Entre os fungicidas avaliados, a trifloxistrobina e a combinação dos três princípios ativos apresentaram os efeitos mais tóxicos, causando impactos metabólicos. Em relação a avaliação do estresse oxidativo, a suplementação alimentar demonstrou efeito protetor ao atenuar parcialmente os impactos dos fungicidas. Observou-se maior estabilidade nos níveis de glutathione reduzida – principal antioxidante celular – e redução nos teores de malondialdeído, marcador de peroxidação lipídica. Adicionalmente, verificou-se menor ativação das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e catalase, indicando que a suplementação contribuiu para a manutenção do equilíbrio redox e redução do estresse oxidativo induzido pelos fungicidas. Embora a suplementação alimentar implicou em maior ação antioxidante, não conferiu proteção completa contra o estresse oxidativo induzido pelos fungicidas. Esses achados ressaltam a necessidade de práticas agrícolas que mitiguem a exposição das abelhas aos fungicidas. Além disso, novas dietas podem ser formuladas para reduzir ainda mais os efeitos desses agrotóxicos sobre a saúde das abelhas.

Palavras-chave: Bixafem, ingredientes ativos, Meliponini, mitocôndrias, prothioconazol, stress oxidativo, trifloxistrobina

**ASSESSMENT OF FUNGICIDE EXPOSURE AND NUTRITIONAL
SUPPLEMENTATION IN STINGLESS BEES OF THE SPECIES *Scaptotrigona*
*postica***

ABSTRACT - The preservation of ecosystems and agricultural productivity depends on entomophilous pollination, which has been impacted by intensive agricultural practices, including the use of pesticides. Although fungicides are considered less harmful than insecticides, they can cause adverse effects on bee health, especially in conditions of food scarcity. This study evaluated the metabolic effects of exposing stingless bees *Scaptotrigona postica* to the active ingredients bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin, components of a commercial fungicide, at doses of 0.7 and 2.7 µg per bee, alone or in combination. Controlled fungicide exposure tests were conducted in a laboratory chamber equipped with an automatic spraying system on moving tracks, designed to accurately replicate field application conditions, and revealed greater exposure in bees positioned at the top of plants and exposed to fine droplets. In a second stage, the effect of these compounds on bees from colonies with and without fermented food supplementation was compared. Food supplementation was investigated as a strategy to mitigate the effects of fungicides, using protein diets that were mixed and fermented for seven days, containing brewer's yeast, soy protein isolate, sugar, soy milk and bee bread. After 14 weeks of supplementation, greater body weight was observed in bees from supplemented colonies compared to the control, indicating nutritional benefits, even without a significant increase in the colonies' food stock. However, the harmful effects of the fungicides were observed in bees from both groups. Mitochondrial respiration was compromised, as evidenced by a reduction in oxygen consumption in complexes I and II of the electron transport chain and a decrease in ATP levels. Among the fungicides evaluated, trifloxystrobin and the combination of the three active ingredients had the most toxic effects, causing metabolic impacts. In relation to the assessment of oxidative stress, food supplementation showed a protective effect by partially attenuating the impacts of the fungicides. There was greater stability in the levels of reduced glutathione - the main cellular antioxidant - and a reduction in the levels of malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation. In addition, there was less activation of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase, indicating that supplementation contributed to maintaining the redox balance and reducing the oxidative stress induced by the fungicides. Although dietary supplementation implied greater antioxidant action, it did not grant complete protection against fungicide-induced oxidative stress. These findings highlight the need for agricultural practices that mitigate the exposure of bees to fungicides. In addition, new diets can be formulated to further reduce the effects of these pesticides on bee health.

Keywords: Active ingredient, bixafem, oxidative stress, Meliponini, mitochondria, prothioconazole, trifloxystrobin

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

O contínuo crescimento da população mundial, somado à crescente demanda por alimentos, tem incentivado o uso intensivo de agrotóxicos como estratégia para maximizar a produtividade agrícola (FAO, 2023). Originalmente, alguns agrotóxicos foram derivados de compostos desenvolvidos durante as Guerras Mundiais, como os inseticidas organofosforados (Goulson, 2013). No entanto, seu uso indiscriminado tem gerado preocupações ambientais, especialmente sobre os impactos em organismos não-alvo, como as abelhas, essenciais para a polinização de culturas e ecossistemas naturais (IPBES, 2019; Silva et al., 2021).

Dentre os agrotóxicos, os fungicidas ocupam uma posição de destaque devido à sua ampla aplicação, muitas vezes coincidente com períodos críticos, como a floração, quando os visitantes florais estão mais vulneráveis à exposição. Apesar de sua importância para a proteção das lavouras, estudos sobre os impactos desses produtos em polinizadores ainda são insuficientes, deixando uma lacuna preocupante no conhecimento científico. A exposição direta ou indireta a fungicidas pode contaminar os recursos alimentares das colônias, ampliando os riscos para a saúde e a funcionalidade das abelhas (Kubik et al., 1999; Pettis et al., 2013; Park et al., 2015; Wood & Goulson, 2017).

Para otimizar o combate a fungos, fungicidas modernos têm sido desenvolvidos com múltiplos princípios ativos, que combinam dois ou três princípios ativos, para ampliar sua eficácia contra patógenos fúngicos (Bayer, 2019). Apesar de sua eficiência no controle de doenças agrícolas, esses compostos também podem afetar organismos não-alvo, como as abelhas, interferindo em processos biológicos essenciais, comprometendo sua saúde, comportamento e sobrevivência (Cham et al., 2019; Toledo-Hernández et al., 2022; Tadei et al., 2019; Bogo et al., 2025). Além disso, em condições de restrição alimentar, ocasionadas pela menor disponibilidade de pólen e néctar, os impactos desses agrotóxicos podem ser exacerbados, afetando negativamente a saúde das colônias e o sistema imunológico das abelhas (Alaux et al., 2010; Tosi et al., 2017; Ramos, 2021).

No Brasil, as abelhas sem ferrão, pertencentes à tribo Meliponini, destacam-se

pela sua relevância ecológica e econômica. Distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, essas abelhas nativas são essenciais na polinização de plantas silvestres e culturas agrícolas, contribuindo diretamente para a biodiversidade e a produção de alimentos (Slaa et al., 2006; Silveira et al., 2002). Contudo, pesquisas envolvendo os impactos de agrotóxicos nessas abelhas ainda são escassas em comparação com os estudos realizados em *Apis mellifera*. Até outubro de 2024, apenas 144 artigos abordaram os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas Meliponini, sendo quase 80% conduzidos no Brasil. Apenas cinco espécies têm sido amplamente investigadas, deixando uma lacuna significativa no conhecimento sobre outras espécies importantes, como *Scaptotrigona postica* (Bogo et al., 2025).

A abelha mandaguari (*Scaptotrigona postica*) é uma das representantes mais relevantes da tribo Meliponini, com papel essencial na polinização de plantas nativas, como o araçá (*Psidium cattleianum*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*), além de culturas agrícolas, como o café (*Coffea arabica*) e o morangueiro (*Fragaria x ananassa*) (Giannini et al., 2015; Slaa et al., 2006; Imperatriz-Fonseca et al., 2012). Apesar de sua importância, pouco se sabe sobre os efeitos combinados de restrição alimentar e exposição a agrotóxicos em abelhas nativas. Mesmo concentrações subletais podem causar danos significativos a órgãos vitais, como o intestino médio e os túbulos de Malpighi, afetando a saúde e a longevidade desses polinizadores, especialmente em situações de exposição crônica (Motta et al., 2018).

A bioenergética das abelhas, fundamental para suas atividades metabólicas e comportamentais, depende dos processos bioquímicos realizados nas mitocôndrias, organelas responsáveis pela produção de ATP (adenosina trifosfato), a principal fonte de energia celular. Esse processo ocorre por meio da fosforilação oxidativa, que utiliza o transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna. Essa produção de energia está diretamente ligada à respiração celular, que inclui etapas como a glicólise e o ciclo de Krebs, essenciais para sustentar funções vitais, como voo, forrageamento e termorregulação (Lehninger et al., 2008; Maia, 2024). Além disso, a estrutura mitocondrial varia de acordo com o tipo celular e o estado fisiológico, refletindo as necessidades energéticas específicas (Fidelis et al., 2024; Ferraz, 2024).

No entanto, fungicidas do grupo das estrobilurinas, como a piraclostrobina, podem interferir diretamente nesse processo, bloqueando a cadeia transportadora de

elétrons e prejudicando a produção de ATP. Essa disfunção compromete atividades essenciais para a saúde das colônias, além de afetar a respiração celular e a integridade mitocondrial (Nicodemo et al., 2014; Freitas et al., 2024b). Em ambientes agrícolas, essas vulnerabilidades são intensificadas pela escassez de recursos florais, típica de paisagens dominadas por monoculturas, limitando ainda mais o metabolismo energético das abelhas (Alaux et al., 2010). Estudos mostram que a piraclostrobina, originalmente desenvolvida para inibir a respiração mitocondrial em fungos, causa efeitos tóxicos semelhantes em *Apis mellifera*, reduzindo significativamente a concentração de ATP e comprometendo a bioenergética mitocondrial (Nicodemo et al., 2020; Fidelis et al., 2024).

Portanto, este trabalho busca investigar as alterações metabólicas em *Scaptotrigona postica* submetidas à suplementação alimentar e expostas ao fungicida comercial de ação tríplice que contém bixafem, protioconazol e trifloxistrobina (Bayer, 2019), com o objetivo de ampliar o entendimento sobre as interações entre toxicidade química e estado nutricional desses importantes polinizadores, para desenvolver estratégias de manejo que contribuam para sua conservação e para a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

1.2 Abelhas nativas no Brasil

As abelhas nativas do Brasil, especialmente as da tribo Meliponini, desempenham um papel essencial nos ecossistemas tropicais, sendo fundamentais para a polinização de uma ampla variedade de plantas nativas e cultivadas. Pertencentes à família Apoidea, essas abelhas são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, com a maior concentração de espécies ocorrendo nas Américas, onde a diversidade é particularmente rica (Nogueira-Neto, 1997; Camargo & Pedro, 2013). São conhecidas popularmente como "abelhas sem ferrão", pois possuem um ferrão vestigial, incapaz de ferroar. Esse grupo é diverso, com mais de 49 gêneros e 400 espécies, apresentando grande variabilidade em fisiologia, morfologia e tamanho, com operárias variando de 0,2 a mais de 20 milímetros (Moure et al., 2007).

Além de sua importância ecológica, essas abelhas desempenham um papel fundamental na agricultura. Elas contribuem diretamente para o aumento da

produtividade e qualidade de culturas como tomate, café, algodão e melancia. Na cultura do café, por exemplo, sua polinização melhora a qualidade e a uniformidade dos grãos, gerando benefícios econômicos para os agricultores (Giannini et al., 2015; Bragaia, 2022). No caso do algodão, embora a planta seja autógama, a presença das abelhas aumenta significativamente a produção e melhora a qualidade das fibras (Pires et al., 2014).

No entanto, essas polinizadoras enfrentam desafios crescentes devido ao desmatamento, à fragmentação de habitats naturais e à expansão de monoculturas, que reduzem a disponibilidade de recursos florais e locais adequados para nidificação. A monocultura das paisagens agrícolas também limita a qualidade nutricional dos recursos disponíveis, prejudicando a saúde e a longevidade das abelhas (De Palma et al., 2015; IPBES, 2019). Esses fatores afetam a dinâmica das colônias e ameaçam a sustentabilidade de ecossistemas inteiros.

A meliponicultura surge como uma estratégia promissora para associar a conservação das abelhas nativas a benefícios econômicos e sociais. Essa prática sustentável permite a produção de mel de alto valor agregado e promove serviços ecossistêmicos essenciais, como a polinização. A eficiência das abelhas nativas em melhorar a qualidade e a produtividade de culturas agrícolas, como café, demonstra sua importância para a segurança alimentar e a economia rural (Yamamoto et al., 2012; Klatt et al., 2014).

1.3 Aspectos gerais da biologia da abelha *Scaptotrigona postica*

A abelha *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804 (Figura 1), popularmente conhecida como mandaguari, é um meliponíneo amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais da América do Sul, especialmente no Brasil, Paraguai e Argentina (Figura 2). No Brasil, sua ocorrência abrange biomas como Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga e Amazônia, sendo particularmente comum em estados como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (Nogueira-Neto, 1997; Alves, 2005). Esses biomas fornecem os recursos florais e locais de nidificação necessários para a sobrevivência e reprodução da espécie, bem como para sua atuação como polinizadora de plantas nativas e cultivadas (Oliveira et al., 2022).



Figura 1. Vista lateral frontal (A) e vista superior traseira (B) de abelha operária de *Scaptotrigona postica*. Fonte: Fototeca Cristiano Menezes, FCM.



Figura 2. Mapeamento atualizado via GBIF (Global Biodiversity Information Facility) de abelhas *Scaptotrigona postica* no período de 1937 a 2023. Fonte: GBIF Secretariat. (2023).

As colônias de abelhas *S. postica* são populosas, podendo abrigar de 2.000 a 50.000 indivíduos, com uma média de aproximadamente 10.000 abelhas por colônia. A organização social da espécie é complexa, com divisão de tarefas claramente definida entre operárias, machos e rainhas. As operárias são responsáveis por atividades como limpeza, defesa e forrageamento, vivendo entre 30 e 40 dias, enquanto as rainhas podem viver por vários anos, garantindo a longevidade e a continuidade da colônia (Nogueira-Neto, 1997; Imperatriz-Fonseca et al., 2012).

Os ninhos de abelhas *S. postica* são geralmente construídos em cavidades de árvores (Figura 3), a alturas que variam de 3 a 7 metros do solo, protegidos por dosséis

de 15 a 20 metros. Essas estruturas florestais, formadas pelas copas densas das árvores, criam um microclima estável, protegendo os ninhos contra chuvas intensas, ventos fortes e temperaturas extremas. As entradas dos ninhos são pequenas, com cerca de 143,5 mm², e são guardadas por abelhas que desempenham um papel crucial na defesa contra predadores e intrusos. Essa combinação de características estruturais e comportamentais reflete as adaptações da espécie às condições ambientais, assegurando a proteção e eficiência das colônias (Michener, 2007; Waldschmidt et al., 2025).

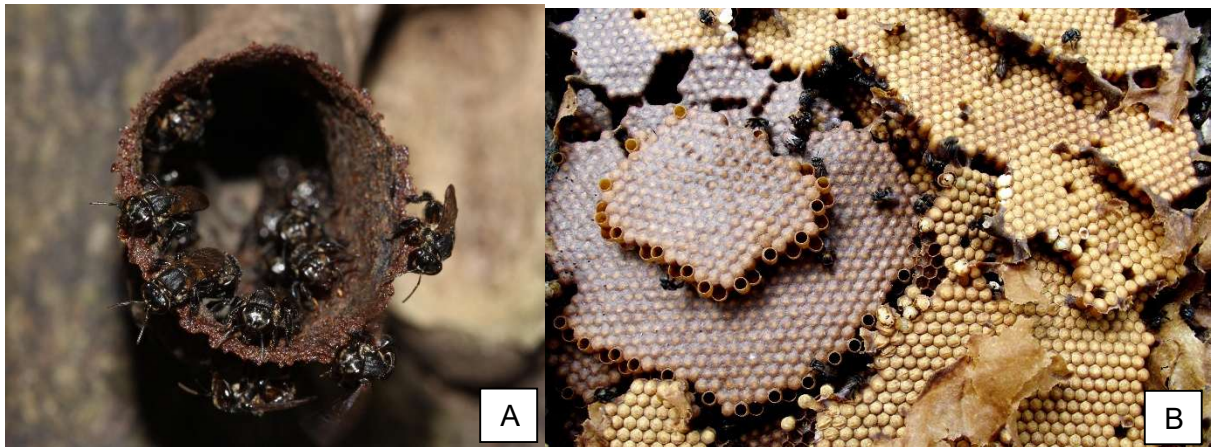


Figura 3. Entrada da colônia (A) e visão interna do ninho mostrando os discos de cria (B) de abelhas *Scaptotrigona postica*. Fonte: Fototeca Cristiano Menezes, FCM.

Apesar de sua adaptabilidade, a abelha *S. postica* enfrenta desafios crescentes devido à fragmentação ambiental e à expansão de monoculturas. Essas mudanças no uso do solo reduzem a disponibilidade de recursos florais diversificados, comprometendo a capacidade de nidificação e reprodução da espécie (Nogueira-Neto, 1997). Ainda assim, *S. postica* desempenha um papel crucial na polinização, tanto em ecossistemas naturais quanto em sistemas agrícolas.

A eficiência dessa espécie como polinizadora é notável. Em cultivos de soja, por exemplo, a polinização por abelhas *Scaptotrigona postica* melhora a uniformidade dos grãos, o peso das sementes e a produtividade geral (Milfont et al., 2013). Em áreas produtoras de algodão, foram registradas até 40 espécies de abelhas nativas, sendo *Scaptotrigona spp.* uma das mais frequentes. No algodoeiro, as abelhas *S. postica* foram observadas realizando polinização cruzada, melhorando a formação de frutos e a qualidade das sementes, especialmente nos estados de Goiás e Paraíba (Pires et

al., 2014; Esquive et al., 2021). Além disso, abelhas *S. postica* e outras abelhas nativas desempenham papéis complementares ao de *Apis mellifera*, promovendo maior diversidade e resiliência nos sistemas agrícolas (Solange et al, 2008).

Outro aspecto relevante da ecologia da abelha mandaguari (*S. postica*) é sua relação simbiótica com fungos. Durante a fase larval, a espécie depende de fungos do gênero *Zygosaccharomyces*, que fornecem ergosterol, um composto essencial para o desenvolvimento saudável das larvas. Essa interação simbiótica ressalta a complexidade das relações ecológicas de *S. postica* e a importância de preservar seus habitats naturais para garantir a continuidade dessas colônias (Menezes et al., 2015; Paludo et al., 2018). Embora seja uma espécie adaptável, a abelha *S. postica* é especialmente suscetível a fatores ambientais adversos, como o uso de agrotóxicos. Estudos apontam que a espécie é mais sensível a compostos químicos, como o dimetoato, em comparação a *Apis mellifera*. Essa vulnerabilidade reflete os impactos negativos do uso intensivo de agrotóxicos na saúde individual das abelhas e na coesão das colônias (Bovo et al., 2024).

Além de sua relevância ecológica, a abelha *S. postica* possui um papel econômico significativo. Na meliponicultura, a espécie é valorizada pela produção de mel de alto valor agregado, reconhecido por suas propriedades medicinais. Sua atuação como polinizadora contribui para a manutenção da biodiversidade, para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e para a geração de renda em comunidades rurais, consolidando-a como um elemento essencial nos ecossistemas tropicais (Nogueira- Neto, 1997; Yamamoto et al., 2012).

1.4 Exposição a agrotóxicos e seus efeitos nas abelhas

A aplicação de agrotóxicos consolidou-se como uma prática indispensável na agricultura contemporânea, impulsionada pela crescente demanda por alimentos devido ao aumento populacional global (FAO, 2023). Esses compostos, amplamente utilizados no controle de pragas, doenças e plantas daninhas, desempenham um papel crucial na otimização da produtividade agrícola (Davis, 2014). Contudo, os impactos negativos associados ao seu uso têm suscitado preocupações crescentes, sobretudo em relação aos danos causados a organismos não-alvo, como as abelhas (Goulson et al., 2015; Pisa et al., 2015).

As abelhas, reconhecidas como agentes essenciais na polinização de culturas agrícolas e ecossistemas naturais, figuram entre os organismos mais vulneráveis à exposição a agrotóxicos. Dependendo do tipo de composto, do nível e do modo de exposição, os efeitos adversos podem variar de subletais a letais, promovendo alterações em funções vitais, como o forrageamento, a comunicação intraespecífica e a cognição (Stanley et al., 2015; David et al., 2016). Entre os diversos tipos de agrotóxicos, os fungicidas destacam-se pela ampla utilização no manejo de doenças fúngicas em culturas agrícolas. Embora eficazes no controle de fungos fitopatogênicos, esses compostos representam um risco considerável para as abelhas, especialmente quando aplicados durante a floração, um período crítico para a atividade de polinização (Kubik et al., 1999).

A persistência de fungicidas sistêmicos no ambiente também agrava a exposição de organismos não-alvo. A eficácia reduzida desses compostos, devido à seleção de linhagens resistentes, tem levado à aplicação de doses progressivamente mais elevadas, intensificando os impactos negativos (Russell, 1995; Ghini e Kimati, 2000). Fungicidas do grupo das estrobilurinas, como a piraclostrobina, interferem diretamente na respiração mitocondrial das abelhas, inibindo a cadeia transportadora de elétrons e reduzindo a produção de ATP. Essa disfunção compromete atividades de alta demanda energética, como o voo e o forrageamento (Nicodemo et al., 2020). Além disso, fungicidas como o boscalide reduzem a frequência de batidas de asas em *Apis mellifera*, embora o consumo de quercetina tenha demonstrado potencial para mitigar esses danos (Huang et al., 2023).

Pesquisas com abelhas nativas reforçam esses achados. Por exemplo, o fungicida piraclostrobina demonstrou alterações significativas na mobilidade (velocidade média, número de paradas e distância percorrida) de *Melipona scutellaris*, mesmo sem causar mortalidade imediata (Domingues, 2021; Inoue et al., 2025). De forma semelhante, Farder-Gomes et al. (2024) avaliaram os impactos da piraclostrobina, do imidacloprido e do glifosato na mesma espécie de abelha sem ferrão, observando redução na locomoção e alterações morfológicas no corpo gorduroso, um órgão essencial para o sistema imunológico. Esses danos, associados a efeitos subletais, refletem o impacto generalizado dos agrotóxicos na saúde das abelhas.

Além dos impactos físicos e metabólicos, os agrotóxicos também afetam funções cognitivas importantes das abelhas, como o forrageamento (Henry et al., 2012), o aprendizado (Stanley et al., 2015), a memória (Samuelson et al., 2016) e até mesmo a fecundidade e o comportamento de rainhas em *Apis mellifera* (Wu-Smart e Spivak, 2016). Tais efeitos comprometem não apenas a eficiência ecológica das abelhas, mas também a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

No Brasil, esse cenário é particularmente alarmante devido à intensificação do uso de agrotóxicos, de acordo com a FAO (2023), foi considerado o país que mais usa agrotóxicos no mundo, com um consumo acima de 710 mil toneladas, só no ano de 2021. Em 2022, mais de 504 ingredientes ou princípios ativos, onde mais de 35% deles não eram autorizados para o uso pela União Europeia e China (Hess e Nodari, 2022). Embora os herbicidas representem aproximadamente 47% do consumo total de agrotóxicos agrícolas, os fungicidas e inseticidas também desempenham papéis relevantes, especialmente em sistemas agrícolas intensivos (Gilson, 2020; IBAMA, 2023). Esse aumento reflete a busca por maior produtividade, mas também revela os riscos crescentes para os polinizadores e a biodiversidade (Isenring, 2010). A aplicação frequente desses compostos durante o dia, período de maior atividade das abelhas, aumenta o risco de contaminação direta e indireta. Resíduos persistentes desses produtos afetam não apenas as abelhas forrageadoras, mas também as crias alimentadas com pólen e néctar contaminados, comprometendo a saúde das colônias (Goulson et al., 2015; Fisher et al., 2023).

Entre os diversos grupos de agrotóxicos, os fungicidas de ação tríplice, destaca-se por sua formulação que combina os princípios ativos Bixafem, protioconazol e trifloxistrobina (Bayer, 2019). Esses compostos atuam de forma complementar em diferentes vias metabólicas dos fungos (Oliver e Hewitt, 2014), mas também apresentam potencial para causar efeitos adversos em abelhas expostas. Essa interação pode amplificar os impactos subletais sobre o metabolismo energético (Freitas et al., 2024b; Nicodemo et al., 2020), especialmente em cenários de restrição alimentar.

1.4.1 Fungicida Bixafem

O Bixafem, pertencente ao grupo químico das carboxamidas, tem se destacado

como um fungicida eficaz no controle de doenças agrícolas devido ao seu mecanismo de ação específico. Esse composto inibe a enzima succinato desidrogenase (SDH), presente no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial dos fungos, interrompendo a produção de energia essencial para a sobrevivência e reprodução dos patógenos (Oliver e Hewitt, 2014). Sua eficácia tem sido amplamente comprovada em culturas de relevância econômica, como trigo, soja e cevada, sendo eficiente contra fungos fitopatogênicos como *Septoria tritici* e *Pyrenophora teres* (Bayer, 2019).

Apesar de seu impacto positivo no manejo de doenças agrícolas, o bixafem apresenta um potencial de risco para organismos não-alvo, como as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, que compartilham processos metabólicos semelhantes aos fungos-alvo. Essa semelhança metabólica as torna vulneráveis à exposição ao fungicida, especialmente devido à interferência no metabolismo energético mitocondrial. Estudos sugerem que o bixafem pode reduzir a produção de ATP, essencial para atividades vitais das abelhas, como voo, forrageamento e termorregulação, comprometendo a eficiência dessas funções e, consequentemente, a saúde das colônias (Ferraz, 2024).

A exposição crônica ao bixafem pode levar a efeitos subletais significativos, incluindo redução na longevidade, perda de capacidade de voo e alterações comportamentais. Esses impactos representam riscos à sustentabilidade das colônias e à funcionalidade ecológica das abelhas como polinizadoras (Nicodemo et al., 2020). Tais efeitos são ainda mais preocupantes em cenários agrícolas tropicais, onde as abelhas sem ferrão desempenham um papel fundamental na polinização de plantas nativas e cultivadas.

O bixafem, um dos princípios ativos de fungicida comercial (Bayer, 2019), quando combinado com prothioconazol e trifloxistrobina, oferece uma ação complementar contra fungos resistentes. Embora seu perfil toxicológico seja considerado ambientalmente menos persistente em solo e água em comparação a outros fungicidas, seus possíveis efeitos sobre abelhas nativas têm gerado preocupações crescentes, especialmente devido à sua aplicação em períodos de floração, quando os polinizadores estão mais expostos.

Estudos recentes destacam a eficácia do bixafem como inibidor da enzima succinato desidrogenase, essencial no ciclo do ácido cítrico, demonstrando seu papel

na redução de infecções fúngicas em culturas de alta produtividade. No entanto, pesquisas indicam a necessidade de investigações mais detalhadas sobre os impactos desse fungicida em organismos não-alvo, como abelhas nativas, dada sua relevância ecológica e econômica (Hawkins et al., 2019; Xu et al., 2022).

1.4.2 Fungicida Protioconazol

O protioconazol é um fungicida sistêmico pertencente ao grupo dos triazóis, amplamente reconhecido por sua eficácia no manejo de doenças agrícolas em culturas como milho, trigo e soja. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da biossíntese de ergosterol, um componente vital para a integridade das membranas celulares dos fungos. Essa inibição provoca disfunções críticas na membrana celular, resultando na morte do patógeno (COMITÊ DE AÇÃO À RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS, n.d.; Meng et al., 2021). Essa eficácia faz com que o protioconazol seja uma ferramenta essencial para a proteção de lavouras, especialmente em sistemas agrícolas intensivos.

Contudo, os impactos do protioconazol não se limitam aos fungos-alvo. Estudos sugerem que esse composto também interfere no metabolismo energético de organismos não-alvo, incluindo polinizadores como as abelhas. Este fungicida compromete a produção de ATP nas mitocôndrias, o que reduz a disponibilidade de energia para funções biológicas essenciais, como voo, forrageamento e reprodução (Henry et al., 2012; Wu-Smart e Spivak, 2016). Essa interferência mitocondrial ocorre devido à desregulação no transporte de elétrons e à alteração na fosforilação oxidativa, evidenciando seu potencial de impacto subletal sobre abelhas (Ferraz, 2024).

Pesquisas demonstram que a exposição ao fungicida pode resultar em redução da eficiência no forrageamento, menor capacidade de voo e maior suscetibilidade a patógenos e doenças em abelhas (Nicodemo et al., 2014; David et al., 2016; Fisher et al., 2021; Motta et al., 2018; Huang et al., 2023). Além disso, o comprometimento do sistema imunológico das abelhas afeta diretamente a saúde das colônias e sua capacidade de desempenhar funções ecológicas cruciais, como a polinização de culturas agrícolas e plantas nativas (Rondeau e Raine, 2024).

A exposição prolongada ao protioconazol, frequentemente aplicada em

períodos críticos, como a floração, quando as abelhas estão mais ativas, levanta preocupações sobre sua ação não seletiva. Essa exposição repetida e cumulativa pode levar a efeitos subletais, incluindo alterações no comportamento de forrageamento, redução na longevidade, supressão do sistema imunológico e impacto na coesão das colônias. Alterações metabólicas e comportamentais, como dificuldade na orientação, redução da comunicação intraespecífica e comprometimento da capacidade de forrageamento, foram observadas em colônias expostas a esse fungicida, reforçando a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor esses impactos (Kato et al., 2024; Freitas et al., 2024b; Alves et al., 2024).

1.4.3 Fungicida Trifloxistrobina

A trifloxistrobina, integrante do grupo das estrobilurinas, desempenha um papel crucial no manejo de doenças agrícolas devido à sua capacidade de inibir o transporte de elétrons no complexo III da cadeia respiratória mitocondrial dos fungos. Essa ação bloqueia a produção de ATP, essencial para a sobrevivência e reprodução dos patógenos, sendo amplamente utilizada para combater fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium spp.* e *Alternaria spp.* em diversas culturas agrícolas, incluindo pomares de frutas, hortaliças de alto valor e grãos como trigo e cevada (Bartlett et al., 2002; Alves et al., 2024).

Apesar de sua eficácia no controle de doenças fúngicas, o uso extensivo da trifloxistrobina levanta preocupações sobre seus impactos potenciais em organismos não-alvo, como polinizadores e microrganismos do solo. Esses organismos desempenham papéis cruciais na manutenção dos ecossistemas agrícolas e naturais. Estudos sugerem que resíduos persistentes desse fungicida no ambiente podem afetar a saúde de insetos não-alvo, especialmente durante a floração, período crítico para a atividade de polinizadores (Zubrod et al., 2019; Bernardes, 2019).

A exposição à trifloxistrobina pode prejudicar a bioenergética mitocondrial das abelhas, reduzindo a produção de ATP. Esse efeito subletal compromete funções vitais, como voo, forrageamento e comunicação intraespecífica, afetando a coesão e a resiliência das colônias. Além disso, esses impactos podem aumentar a vulnerabilidade das abelhas a patógenos, especialmente em ambientes agrícolas intensivos e em condições de escassez de recursos florais (Nicodemo et al., 2020).

Pesquisas preliminares indicam que abelhas *Apis mellifera* e espécies nativas como a *Scaptotrigona postica* apresentam respostas adversas ao contato com a trifloxistrobina (Alves et al., 2024; Kato et al., 2024; Freitas et al., 2024a; Freitas et al., 2024b; Ferraz, 2024). Esses danos incluem disfunções na bioenergética mitocondrial, que comprometem a concentração de ATP, essencial para funções metabólicas vitais. Esses achados reforçam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre os impactos específicos de fungicidas em abelhas nativas, considerando seu papel indispensável na polinização de ecossistemas tropicais e subtropicais (Goulson, 2013).

Além disso, a aplicação da trifloxistrobina durante o dia, período em que as abelhas estão mais ativas, agrava o risco de exposição direta. Resíduos persistentes no ambiente aumentam a exposição indireta, afetando não apenas as abelhas forrageiras, mas também as crias, alimentadas com pólen e néctar contaminados, comprometendo a saúde das colônias a longo prazo (Van der Sluijs et al., 2013; Fisher et al., 2023).

1.5 Interação entre exposição a agrotóxicos e restrição alimentar em abelhas

A interação entre exposição a agrotóxicos e restrição alimentar representa um desafio crítico para a saúde e funcionalidade das colônias de abelhas. Estudos indicam que dietas pobres em nutrientes podem amplificar os efeitos subletais de fungicidas, resultando em alterações metabólicas e redução na longevidade de abelhas nutrízes da espécie *Apis mellifera* (Gaubert et al., 2023; Hsieh e Dolezal, 2024). Além disso, a exposição a fungicidas agrícolas tem sido associada ao comprometimento do desenvolvimento e funcionalidade de abelhas sem ferrão durante suas fases imaturas, destacando os impactos negativos combinados de condições ambientais adversas e uso de agrotóxicos (Diniz et al., 2021). Esses impactos tornam-se ainda mais pronunciados em ambientes onde as condições climáticas e a perda de biodiversidade limitam a disponibilidade de recursos florais de boa qualidade (Ferraz, 2024).

As abelhas possuem necessidades nutricionais específicas, sendo que a nutrição adequada desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das crias, na produção de mel e pólen, bem como na resistência a patógenos e estressores ambientais. A escassez de recursos florais ou a sua baixa qualidade nutricional pode

intensificar a vulnerabilidade das abelhas a agrotóxicos. Nessas condições, a suplementação alimentar surge como uma ferramenta estratégica para melhorar a saúde das abelhas e aumentar sua resistência aos estressores químicos e ambientais (Pacífico-da-Silva et al., 2016; Freitas et al., 2024).

Estudos demonstram que colônias de abelhas submetidas a dietas suplementares apresentam maior resistência a doenças e agrotóxicos, além de maior produtividade em termos de mel e pólen. A suplementação alimentar, especialmente com proteínas e carboidratos, está diretamente associada a um melhor desenvolvimento das colônias, aumento da longevidade das operárias e fortalecimento do sistema imunológico das abelhas. Esses fatores são essenciais para sua resistência a estresses ambientais, como exposição a agrotóxicos e escassez de recursos florais (Alaux et al., 2010). Durante períodos críticos, como o desenvolvimento larval, a deficiência nutricional pode comprometer o sistema imunológico e a longevidade das abelhas, enfatizando a importância de uma dieta balanceada (de Azevedo Guedes et al., 2024). Além disso, estudos apontam que a qualidade nutricional da dieta, incluindo a proporção adequada de proteínas e carboidratos, aumenta a tolerância das abelhas a toxinas e melhora sua capacidade de metabolizar compostos prejudiciais, como agrotóxicos (Barascou et al., 2021).

A restrição alimentar reflete a complexa interação entre as necessidades energéticas nutricionais das abelhas e os riscos associados à exposição a agrotóxicos. Essa situação é agravada pela privação de pólen, que, durante a fase larval, pode resultar na formação de adultos mais suscetíveis a toxinas e outros estressores (Batista et al., 2018). Assim, a suplementação alimentar com fontes ricas em proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas torna-se indispensável para mitigar esses efeitos, promovendo o desenvolvimento saudável das colônias e sua resiliência frente a desafios ambientais (Maia, 2024). Os métodos de suplementação nutricional variam de acordo com fatores como a espécie de abelha, a época do ano e as condições climáticas. Técnicas como o uso de alimentadores internos e externos ou a plantação de flores com pólen e néctar ricos em nutrientes podem ser implementadas para oferecer alimentos suplementares, como pólen desidratado, leveduras e açúcares (Batista et al., 2018; Ferraz, 2024). A introdução de dietas suplementares em abelhas tem mostrado impactos positivos significativos, como o

aumento da eficiência na polinização, maior robustez na produção de mel e redução das taxas de mortalidade (Omar et al., 2017; Lamontagne-Drolet et al., 2019).

Este estudo avaliou os efeitos de fungicidas isolados e combinados (Bixafem, protioconazol e trifloxistrobina; Bayer, 2019) sobre *Scaptotrigona postica* - espécie modelo selecionada por sua relevância ecológica e sensibilidade a agrotóxicos. Como polinizadora-chave em cultivos agrícolas e amplamente distribuída nos biomas brasileiros, *S. postica* oferece vantagens metodológicas únicas: abundância populacional que permite amostragens robustas; tolerância a condições controladas; e respostas fisiológicas representativas de outras abelhas nativas tropicais. Foram testadas doses tóxicas de 0,7 µg/abelha e 2,1 µg/abelha, simulando exposições realistas em campo (Freitas et al., 2024b). As análises incluíram: toxicidade por contato, preferência alimentar (suplemento proteico vs. outras fontes), desempenho bioenergético mitocondrial (“in vitro” e “in vivo” via consumo de oxigênio), e estresse oxidativo, quantificado por atividade das enzimas GPx e CAT, níveis de GSH e NAD(P)H, e marcadores de dano oxidativo (oxidação de grupos tióis e lipoperoxidação).

Referências

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters** 6:562-565. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>>

Alves RMO, Souza BA, Carvalho CAL, Justina GD (2005) **Custo de produção de mel: uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos**. Cruz das Almas: UFBA/SEAGRI-BA. 14 p. (Série Meliponicultura, 2). Disponível em: <https://www2.ufrb.edu.br/insecta/images/publicacoes/meliponicultura/Serie_Meliponicultura_n2.pdf>

Alves TRR et al. (2024) Pollen contaminated with a triple-action fungicide induced oxidative stress and reduced longevity though with less impact on lifespan in honey bees from well fed colonies. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 112:104587. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104587>>

Bayer SA (2019) **Fox Xpro: Fungicida**. Agro Bayer. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protECAodecultivos/fox-xpro>>.

Barascou L et al. (2021) Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. **Royal Society Open Science** 8(9):210818. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsos.210818>>

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR et al. (2002) The strobilurin fungicides. **Pest**

Management Science 58(7):649-662. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1002/ps.520>

Batista MDC da S et al. (2018) Alimentação das abelhas: revisão sobre a flora apícola e necessidades nutricionais. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management** 14(1):62-72. Disponível em: <http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/4001/2444>.

Bernardes LM (2019). Otimização da tecnologia de aplicação para o controle de lepidópteros desfolhadores na cultura da soja. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/194130>

Bogo G et al. (2025) Current status of toxicological research on stingless bees (*Apidae*, *Meliponini*). **Science of the Total Environment** 959:178229. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178229>

Bovo, J et al. (2024) Efeitos da Exposição a Tiametoxame e Piraclostrobina no Desenvolvimento de Estruturas Sensoriais em Abelhas Recém-Emergidas de *Scaptotrigona Postica*. **SSRN**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4685684>

Bragaia IMDS (2022) **A importância econômica da polinização em culturas de café no manejo agroecológico brasileiro**. Trabalho de Conclusão de Curso – UNESP, Rio Claro. 30 p. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/11449/216530>

Camargo JMF, Pedro SEM (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR (Eds.) **Catálogo de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, p. 272-578.

Cham KO, Nocelli RC, Borges LO et al. (2019) Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology** 48(1):36-48. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

COMITÊ DE AÇÃO À RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS (Brasil) Modo de ação de fungicidas. Disponível em: <<https://www.frac-br.org/modo-de-acao>.

David A et al. (2016) Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides. **Environment International** 88:169-178. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>

DAVIS FR (2014) **Banned: A History of Pesticides and the Science of Toxicology**. New Haven: Yale University Press.

De Azevedo Guedes MV et al. (2024) Efeito da inclusão da farinha de mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) para suplementação proteica de abelhas urucu (*Melipona scutellaris*). **Observatório de la Economía Latinoamericana** 22(10):e7083. Disponível em: <<https://doi.org/10.55905/oelv22n10-066>

De Palma A et al. (2015) Ecological traits affect the response of bee communities to land-use pressures in European agricultural landscapes. **Journal of Applied Ecology** 52:1565-1575. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12524>>

Diniz T de O et al. (2021) Efeitos do fungicida combinado em abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento** 1:1-12. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12029>>

Domingues CEDC (2021) **Análise dos efeitos do fungicida piraclostrobina e do inseticida acetamiprida em abelhas eussociais (*Hymenoptera: Apidae*)**. Tese (Doutorado) – UNESP, Jaboticabal. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/204110>>

Esquivel IL, Parys KA, Wright KW et al. (2021) Crop and semi-natural habitat configuration affects diversity and abundance of native bees (*Hymenoptera: Anthophila*) in a large-field cotton agroecosystem. **Insects** 12(7):601. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/insects12070601>>

Farder-Gomes CF, de Oliveira MA, Malaspina O, Nocelli RFC (2024) Exposure of the stingless bee *Melipona scutellaris* to imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate, alone and in combination, impair its walking activity and fat body morphology and physiology. **Environmental Pollution** 348:123783. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123783>>

FAO (2023) **The State of Food Security and Nutrition in the World 2023 (SOFI)**. Roma: FAO. Disponível em: <<https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc3017en>>

Ferraz YMM (2024) **Efeito da nutrição e da própolis verde sobre aspectos biológicos em abelhas melíferas expostas ao fungicida Fox Xpro**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/11449/256929>>

Fidelis JP da S, Miranda CA, Nicodemo, D, & Mingatto, FE (2024). Clomazone herbicide impairs bioenergetics in mitochondria isolated from the thorax of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 7(2):e70709. Disponível em: <<https://doi.org/10.34188/bjaerv7n2-106>>

Fisher II A et al. (2023) The challenge of balancing fungicide use and pollinator health. In: **Advances in Insect Physiology**. v.64. Londres: Academic Press, p. 117-190. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2023.01.002>>

Fisher II A et al. (2021) Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mito-toxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution** 269:115964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115964>>

Fototeca Cristiano Menezes, FCM Disponível em: <<https://specieslink.net/search/images/col/477/taxon/Scaptotrigona%20postica>>

Freitas TA d. L et al. (2024a) Contact exposure of honey bees and social stingless bees to fungicide sprayed on cotton and soybean in a controlled field simulation system. **Journal of Applied Entomology** 148:861-869. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jen.13293>

Freitas TA d. L et al. (2024b) Food supplementation does not prevent oxidative stress in forager honey bees exposed to the fungicides Bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin. **Journal of Apicultural Research** 1-12. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2406101>

Gaubert J, Giovenazzo P, Derome N (2023) Individual and social defenses in *Apis mellifera*: A playground to fight against synergistic stressor interactions. **Frontiers in Physiology** 14:1172859. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1172859>

GBIF Secretariat (2023) **GBIF Backbone Taxonomy: *Scaptotrigona postica*** (Latreille, 1807) [Checklist dataset]. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://doi.org/10.15468/39omei>

Ghini R, Kimati H (2002) **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 78p. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/13231>

Giannini TC, Cordeiro GD, Freitas BM et al. (2015) The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology** 108(3):849-857. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>

Gilson IK et al. (2020) Agrotóxicos liberados nos anos de 2019-2020: uma discussão sobre o uso e a classificação toxicológica. **Brazilian Journal of Development** 6(7):49468-49479.

Goulson D (2013) Uma visão geral dos riscos ambientais representados por inseticidas neonicotinoides. **Journal of Applied Ecology** 50(4):977-987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>

Goulson D, Nicholls E, Botías C et al. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science** 347(6229):1255957. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1255957>

Hawkins NJ, Bass C, Dixon A et al. (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews** 94(1):135-155. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/brv.12440>

Henry M, Béguin M, Requier F et al. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science** 336(6079):348-350. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1215039>

Hess SC, Nodari R (2022) Agrotóxicos no Brasil: panorama dos produtos aprovados entre 2019 e 2022. **Revista Ambientes em Movimento** 2(2):40-52.

Hsieh EM, Dolezal AG (2024) Nutrition, pesticide exposure, and virus infection interact to produce context-dependent effects in honey bees (*Apis mellifera*). **Science of the Total Environment** 949:175125. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175125>

Huang M, Dong J, Yang S et al. (2023) Efeitos ecotoxicológicos de fungicidas comuns na abelha-do-leste *Apis cerana cerana* (Hymenoptera). **Ciência do Meio Ambiente Total** 868:161637. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161637>

IBAMA (2023) **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Brasília: IBAMA. Disponível em <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-decomercializacao-deagrotoxicos#:~:text=Em%202023%2C%20um%20total%20de,Decreto%20n%C2%B0%204.074%2F2002>

Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Alves D de A et al. (2012) **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP. Disponível em: <<http://www.livrosabertos.edusp.usp.br/edusp/catalog/book/8>

Inoue LVB (2025) **Efeitos do inseticida flupiradifurona e dos fungicidas piraclostrobina e fluxapiroxade no comportamento e morfofisiologia de *Melipona scutellaris***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/11449/261125>

IPBES (2019) **Resumo para formuladores de políticas do relatório de avaliação global sobre biodiversidade e serviços ecossistêmicos**. Bonn: Secretariado do IPBES.

Isenring R (2010) **Pesticides and the loss of biodiversity**. PAN Europe Report 10:1-32. Disponível em: <https://www.pan-europe.info/old/Campaigns/pesticides/documents/bees/Pesticides_and_the_loss_of_biodiversity.pdf

Kato AY, Freitas TAL, Gomes CRA et al. (2024) Bixafen, Prothioconazole, and Trifloxystrobin alone or in combination have a greater effect on health related gene expression in honey bees from nutritionally deprived than from protein supplemented colonies. **Insects** 15(7):523. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/insects15070523>

Klatt BK et al. (2014) Bee pollination improves crop quality, shelf life, and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B** 281(1775):20132440. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2440>

Kubik M et al. (1999) Residues of pesticides in bee products from Poland. **Apidologie** 30:521-532. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:19990607>

Lamontagne-Drolet M et al. (2019) The impacts of two protein supplements on commercial honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Journal of Apicultural Research** 58(5):800-813. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1644938>>

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2008) **Principles of Biochemistry**. 5ª ed. New York: W.H. Freeman.

Maia AG (2024) **Avaliação do potencial nutricional e toxicidade de vegetais na alimentação suplementar de abelhas canudos**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/37289>>

Menezes C, Neto A, Contrera F et al. (2013) The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Berlin: Springer, p. 153-171. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10>.

Meng Z, Tian S, Sun W et al. (2021) Efeitos da exposição ao protioconazol e seu metabólito protioconazol-destio sobre o estresse oxidativo e os perfis metabólicos dos tecidos hepático e renal em camundongos machos. **Environmental Pollution** 269:116215. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116215>>

Michener CD (2007) **The Bees of the World**. 2ª ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Milfont MO et al. (2013) Higher soybean production using honeybee and wild pollinators, a sustainable alternative to pesticides and autopollination. **Environmental Chemistry Letters** 11:335-341. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-013-0412-8>>

Motta EVS, Raymann K, Moran NA (2018) Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 115(41):10305-10310. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>>.

Moure JS, Urban D, Melo GAR (2007) **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. São Paulo: USP.

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, et al. (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees **Environmental Toxicology and Chemistry** 39:1267–1272. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4719>>

Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC et al. (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry** 33(9):2070-2075. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.2655>>

Nogueira-Neto P (1997) **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis.

Oliver RP, Hewitt HG (2014) **Fungicides in Crop Protection**. 2^a ed. Wallingford: CABI. 320 p. Disponível em: <<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/abs/10.1079/9781780641669.0000>>

Oliveira GN de, Batista ER, Malagodi-Braga KS (2022) Uso de recursos florais por abelhas em sistema agroecológico de produção, com foco nas abelhas-nativas-sem-ferrão. In: **16º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica (CIIC)**. Anais... Campinas: Instituto Agrônômico, p. 1-12. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1150530>>

Omar E et al. (2017) Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie** 48(4):425-436. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0487-x>>

Pacífico-da-Silva I, Melo MM, Soto-Blanco B (2016) Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 10(1):142-157. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5391733>>

Paludo CR, Menezes C, Silva-Junior EA et al. (2018) Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports** 8:1122. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19583-9>>

Park MG, Blitzer EJ, Gibbs J et al. (2015) Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. **Proceedings of the Royal Society B** 282(1809):20150299. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0299>>

Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M et al. (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE** 8(7):e70182. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>>

Pires VC, Arantes RCC, Torezani KRS et al. (2014) Abelhas em áreas de cultivo de algodoeiro no Brasil. In: **Abelhas e polinização no agronegócio brasileiro**. Brasília: Embrapa, p. 55. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1002384>>

Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP et al. (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research** 22:68-102. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>>

Ramos JD (2021) **Potenciais efeitos da exposição a fungicidas agrícolas para abelhas-sem-ferrão imaturas: conservação de polinizadores e políticas públicas**. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/9902>>

Rondeau S, Raine NE (2024) Single and combined exposure to 'bee safe' pesticides alter behaviour and offspring production in a ground-nesting solitary bee (*Xenoglossa pruinosa*). **Proceedings of the Royal Society B** 291:20232939. Disponível em: <<http://doi.org/10.1098/rspb.2023.2939>>

Russell PE (1995) Fungicide resistance: occurrence and management. **The Journal of Agricultural Science** 124(3):317-323. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0021859600073275>>

Samuelson E, Chen-Wishart Z, Gill R et al. (2016) Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze. **Scientific Reports** 6:38957. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep38957>>

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira. 253 p.

Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS et al. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie** 37(2):293-315. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:2006022>>

Solange ABS, Ana CR, Luci RB (2008) Pollination of cucumber (*Cucumis sativus*) by the stingless bees *Scaptotrigona aff. depili* and *Nannotrigona testaceicornis* in greenhouses. **Neotropical Entomology** 37:506-512.

Stanley DA, Smith KE, Raine NE (2015) Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. **Scientific Reports** 5:16508. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep16508>>

Tadei R, Domingues CEC, Malaquias JB et al. (2019) Efeito tardio da coexposição larval ao inseticida clotianidina e ao fungicida piraclostrobina em *Apis mellifera africanizada*. **Scientific Reports** 9:3277. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>

Toledo-Hernández E, Peña-Chora G, Hernández-Velázquez VM et al. (2022) The stingless bees (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*): a review of the current threats to their survival. **Apidologie** 53:8. Disponível: <<https://doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>>

Tosi S, Nieh JC, Sgolastra F et al. (2017) Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B** 284(1869):20171711. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1711>>

Van der Sluijs JP et al. (2013) Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability** 5:293-305. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.05.007>>

Waldschmidt AM, Figueredo L, Menezes RA et al. (2025) Nidification and nest architecture of the stingless bee *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) in Caatinga, Bahia, Brazil. **Journal of Apicultural Research** 1-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2025.2466282>>

Wood TJ, Goulson D (2017) The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research** 24:17285-17325. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>>

Wu-Smart J, Spivak M (2016) Sub-lethal effects of pesticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. **Scientific Reports** 6:32108. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep32108>>

Xu X, Wang X, Yang Y et al. (2022) Neonicotinoides: mecanismos de toxicidade sistêmica baseados em estresse oxidativo-dano mitocondrial. **Archives of Toxicology** 96:1493-1520. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-022-03267-5>>

Yamamoto M, da Silva CI, Augusto SC et al. (2012) The role of bee diversity in pollination and fruit set of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*) crop in Central Brazil. **Apidologie** 43:515-526. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-012-0120-6>>

Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G et al. (2019) Fungicides: an overlooked pesticide class? **Environmental Science & Technology** 53(7):3347-3365. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>>

CAPÍTULO 2 – Exposição por contato de abelhas sociais sem ferrão a fungicidas pulverizados em algodão e soja em um sistema de simulação de campo controlado

RESUMO – As abelhas podem ser expostas a agrotóxicos quando visitam plantações ou áreas adjacentes afetadas pela deriva de pulverização. Entre as categorias de agrotóxicos, os fungicidas tendem a ser considerados relativamente seguros, embora também possam afetar negativamente a saúde dos polinizadores. A maioria das evidências de danos causados por fungicidas às abelhas vem de testes de laboratório; há poucas informações sobre os níveis de contaminação no campo. Examinamos a exposição em uma espécie de abelha nativa brasileira comum entre as abelhas sociais sem ferrão (*Scaptotrigona postica* Latreille; Hymenoptera: Apidae), que tem cerca de um terço do tamanho de uma abelha melífera, a um fungicida comercial, com três princípios ativos (bixafem, protioconazol e trifloxistrobina). Este fungicida é aplicado às culturas que as abelhas visitam com frequência e seu uso foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Um aparelho de pulverização montado sobre esteiras em uma sala de pulverização foi usado para simular as condições de campo. Plantas de soja e algodão cultivadas em vasos foram transferidas para a sala de pulverização quando as plantas estavam em florescimento. Abelhas anestesiadas foram presas com alfinetes de inseto no topo e no meio das plantas, nas folhas e nas flores. O fungicida comercial foi aplicado com gotas finas ou grossas. As quantidades dos princípios ativos individuais absorvidos pelas abelhas foram então quantificadas. As concentrações de trifloxistrobina foram mais altas, seguidas pelo bixafen e, depois, pelo protioconazol, que foi detectado nas abelhas em níveis muito mais baixos. De modo geral, as abelhas que estavam no topo das plantas foram expostas a maiores quantidades dos agrotóxicos. Os testes que utilizam sistemas de pulverização que simulam as condições de campo podem proporcionar a definição de doses reais que contaminam as abelhas, de modo a favorecer a compreensão do impacto dos fungicidas e outros agrotóxicos aplicados às plantações.

Palavras-chave: Agrotóxicos, bixafem, protioconazol, *Scaptotrigona postica*, trifloxistrobina.

CHAPTER 2 – Contact exposure of social stingless bees to fungicide sprayed on cotton and soybean in a controlled field simulation system

ABSTRACT - Bees can be exposed to agrotoxics when they visit plantations or adjacent areas affected by spray drift. Among the categories of agrotoxics, fungicides tend to be considered relatively safe, although they can also negatively affect the health of pollinators. Most evidence of fungicide damage to bees comes from laboratory tests; there are few information on contamination levels in the field. We examined exposure in a native Brazilian bee species common among stingless social bees (*Scaptotrigona postica* Latreille; Hymenoptera: Apidae), which is about a third the size of a honey bee, to a commercial fungicide with three active ingredients (bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin). This fungicide is applied to crops that the bees visit frequently and was used according to the manufacturer's instructions. A track-mounted sprayer in a spray room was used to simulate field conditions. Soybean and cotton plants grown in pots were transferred to the spray room when the plants were in bloom. Anaesthetized bees were attached with insect pins to the top and middle of the plants, to the leaves and to the flowers. The commercial fungicide was applied with fine or coarse drops. The amounts of the individual active ingredients absorbed by the bees were then quantified. The concentrations of trifloxystrobin were the highest, followed by bixafen and then prothioconazole, which was detected in the bees at much lower levels. In general, the bees that were at the top of the plants were exposed to greater quantities of the agrotoxics. Tests using spraying systems that simulate field conditions can help define the real doses that contaminate bees, in order to help understand the impact of fungicides and other agrotoxics applied to crops.

Keywords: Agrotoxics, bixafem, prothioconazole, *Scaptotrigona postica*, trifloxystrobin.

2.1 Introdução

Fungicidas não são os agrotóxicos mais comuns a serem utilizados na agricultura e frequentemente não são considerados um risco para as abelhas (Zhang, 2018). Entretanto, a inocuidade aparente dessa classe de agrotóxicos para as abelhas, comparado com inseticidas, pode subestimar danos potenciais para esses polinizadores. Para vários fungicidas comerciais, não há restrições no uso, incluindo durante os períodos de floração das culturas, levantando dúvidas sobre os danos ambientais para a saúde das abelhas (National Honey BeeHealth Stakeholder Conference Steering Committee, 2012), uma vez que os visitantes florais das plantas tratadas podem ser contaminados diretamente ou coletar pólen e néctar contaminados, os quais eles transportam de volta a colônia para alimentar abelhas jovens e larvas (Kubik et al., 1999).

Fungicidas são aplicados nas culturas para controlar e reduzir infestações de fungos patogênicos; entretanto, as propriedades intrínsecas dos agentes patogênicos e utilização repetida, frequentemente resultam em resistência e controle inadequado (Hollomon, 2015). A eficácia reduzida desses produtos é compensada algumas vezes pela aplicação de doses cada vez mais elevadas, aumentando a contaminação ambiental (Ghini e Kimati, 2000; Lucas et al., 2015). Para ajudar a superar resistência dos fungos, fungicidas com dois ou mais princípios ativos (p. a.) de grupos distintos, têm sido desenvolvidos (Dekker, 1995). Um exemplo é o fungicida comercial de tripla ação, contendo bixafem, protioconazol e trifloxistrobina (Bayer, 2019), que foi aprovado no Brasil para o controle de fungos patogênicos que afetam culturas de algodão, cevada, girassol, milho e soja. Esse produto comercial contém os princípios ativos Bixafem, protioconazol e trifloxistrobina. Usado isoladamente ou em associação com outros fungicidas ou até mesmo inseticidas, esses p.a. também são comumente utilizados em outros países (Brenet et al., 2021; Feng et al., 2022; López-Ballesteros et al., 2022). Em 2021, 5.05 toneladas de trifloxistrobina, 4.19 toneladas de protioconazol e 2.06 toneladas de Bixafem foram vendidos para fazendeiros no Brasil, este último produto é o mais aprovado recentemente (IBAMA, 2022).

Existem numerosos relatórios de pesquisas de experimentos conduzidos em laboratório que reportam danos às abelhas causados por fungicidas, incluindo vários efeitos sub letais, tais como alterações no comportamento (Artz; Pitts-Singer, 2015;

Fisher et al., 2021), redução da longevidade de abelhas adultas (Fisher et al., 2023), efeitos negativos nas células e microbiota intestinal (Carneiro et al., 2020; DeGrandi-Hoffman et al., 2017; Tadei et al., 2019), alterações no sistema imunológico (Cizeljet al., 2016), deficiências nutricionais, que tornam as abelhas mais suscetíveis a patógenos (DeGrandi-Hoffman et al., 2015), e inibição da função mitocondrial, que reduz a energia necessária para voo e outras atividades (Nicodemo et al., 2020).

Algumas pesquisas mostraram que doses relevantes de fungicida no campo são prejudiciais para as abelhas (Belsky; Joshi, 2020; Ricke et al., 2021; Zaluski et al., 2017). Os níveis de contaminação aos quais as abelhas estão expostas devido à aplicação de fungicidas em culturas agrícolas são uma preocupação significativa. Estudos mostram que, além dos efeitos diretos, esses fungicidas podem ser ainda mais prejudiciais quando interagem de forma sinérgica com outros agrotóxicos, doenças ou pragas, potencializando os danos às colônias (Fisher et al., 2023; Rondeau & Raine, 2022). Para avaliar se o uso de um agrotóxico no campo pode impactar a saúde das abelhas, é necessário determinar a concentração ambiental do agrotóxico baseado na dose aplicada. Para esse propósito, o modelo BeeREX é utilizado em alguns países, tais como o Brasil, os Estados Unidos e o Canadá (IBAMA, 2020; U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) et al., 2014). Para determinar a dose que pode afetar uma abelha através do contato por pulverização foliar, esse modelo implica um método indireto, que considera a dose 2.4 µg de p. a. por abelha para cada kg de p. a./ha tratado como maior nível de exposição (Koch e Weisser, 1997). Os pesquisadores se basearam na exposição de um marcador fluorescente em abelhas que visitaram livremente a área tratada. Esse método não leva em consideração a natureza química dos agrotóxicos, que podem interferir em sua distribuição (Luckham, 1989). Além disso, não há evidências em relação à presença de abelhas nas plantas na hora da aplicação. Nesse contexto, desenvolver um método de avaliação mais realista pode ser benéfico para avaliar o risco ambiental dos agrotóxicos para as abelhas.

Abelhas nativas são menos conhecidas, devido a sua distribuição apenas em regiões neotropicais. Uma espécie típica de abelha sem ferrão é a mandaguari (*Scaptotrigona postica* Latreille; Hymenoptera, Apidae), que tem quase um terço do tamanho da abelha melífera. Ela normalmente visita culturas em floração no Brasil, e

é utilizada como polinizadora para essas culturas, o que a torna vulnerável à contaminação por agrotóxicos (Rosa et al., 2015).

Se existirem erros na dosagem e diluição dos agrotóxicos, ajustes no equipamento de pulverização e aplicação em condições ambientais adversas, os níveis de exposição das abelhas são drasticamente alterados. Então, com este trabalho, propõem-se e testou-se um método para estimar a dose do p. a. que as abelhas são expostas quando aplicado um fungicida comum de acordo com recomendações agronômicas em culturas de algodão e soja.

2.2. Material e Métodos

2.2.1 Localização da pesquisa e cultivo do algodão e soja

O experimento foi conduzido na cidade de Dracena, estado de São Paulo (latitude 21°27'30" S e longitude 51°33'22" W, na altitude de 421 m). Cem vasos plásticos de 5L foram preenchidos com solo comum, que foi corrigido com calcário e adubo mineral, de acordo com recomendações para as culturas do algodão e da soja (Cantarella et al., 2022). Em 50 vasos, três sementes de soja cultivar TMG 7067 foram semeadas, e em outros 50 vasos, foram semeadas três sementes de algodão cultivar IAC 24. As sementes para essas duas culturas foram obtidas dos produtores de sementes "Tropical Melhoramento e Genética" e "Instituto Agronômico de Campinas", respectivamente. As plantas foram cultivadas em uma estufa com irrigação apropriada e controlada. Três semanas após a germinação, as plantas foram desbastadas para que apenas uma planta permanecesse por vaso.

2.2.2 Aplicação da solução de fungicida nas plantas e abelhas em um ambiente controlado

Quando atingiram o estágio de floração, as plantas foram levadas para a sala de pulverização controlada. As plantas foram organizadas em duas linhas espaçadas com 45 cm (Figura 1). Esse recinto não é afetado pelo vento e as aplicações foram feitas com temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $57 \pm 4\%$.



Figura 1. Plantas de algodão em floração dispostas na sala de pulverização do Laboratório de Tecnologia de Aplicação. Fonte: Arquivo Pessoal.

No mesmo dia que os potes com as plantas foram colocados na sala de pulverização, abelhas *Scaptotrigona postica* que retornam para a colônia foram coletadas das entradas de três colônias, com o objetivo de obter apenas as campeiras. As abelhas foram colocadas em novos recipientes de plástico de 0,25L com tampas perfuradas, permitindo a troca de gases. As abelhas foram anestesiadas em um freezer a -18 °C por alguns minutos (Nicodemo et al., 2014), e então foram fixadas as plantas, com o auxílio de alfinetes (Figura 2).

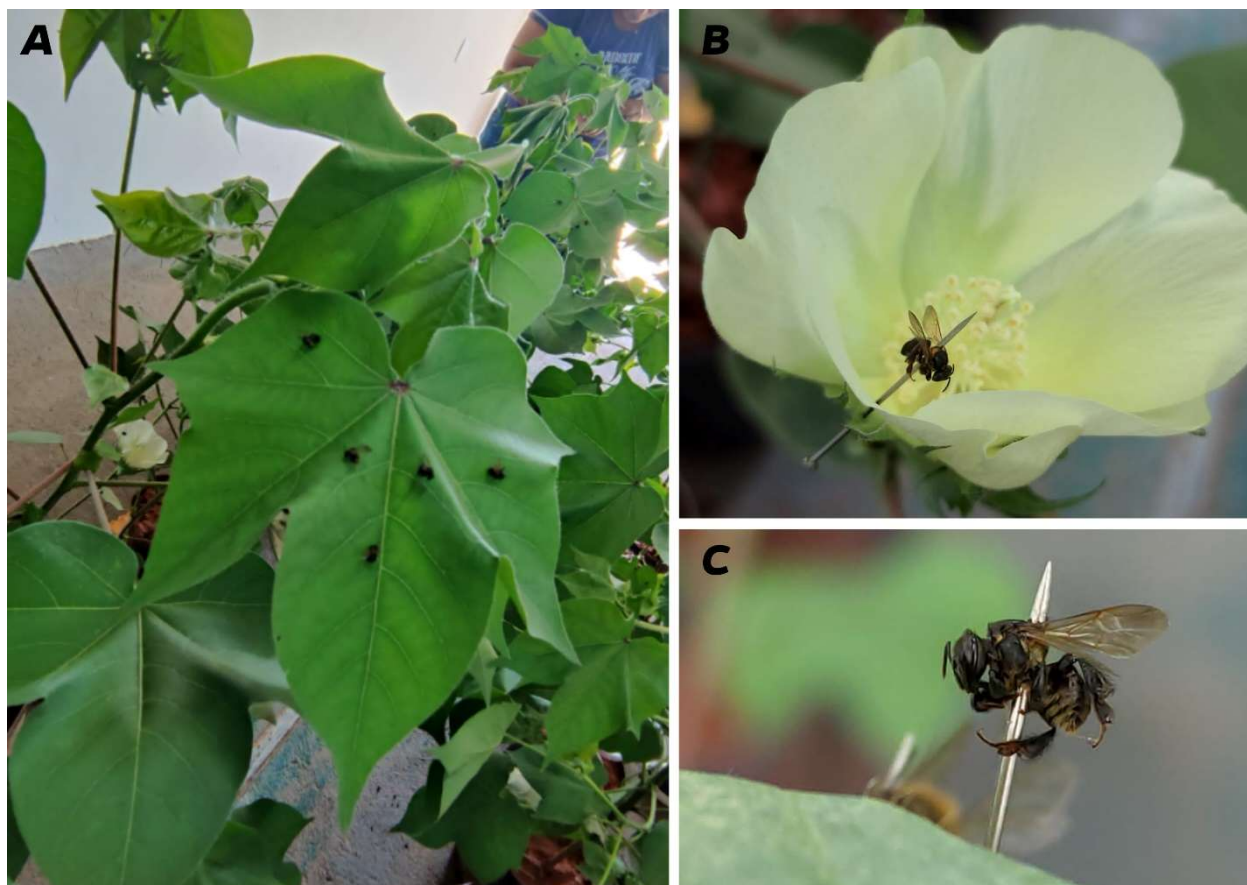


Figura 2. Abelhas *Scaptotrigona postica* presas às plantas de algodão com alfinetes entomológicos (C), na parte superior (A) e nas flores (B) antes da pulverização com fungicida. Fonte: Arquivo Pessoal.

O fungicida comercial a base de Bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina foi aplicado usando um simulador de pulverização equipado com uma barra de pulverização com quatro bicos espaçados a 0,5 m entre intervalos, em um volume de pulverização de 144 L. ha⁻¹, em uma dose de 0,5 L. ha⁻¹ do produto comercial (Bayer, 2019), conforme recomendado no rótulo para ambas as culturas. Como o produto é uma suspensão, a embalagem do produto foi agitada manualmente por 3 minutos antes da aplicação. A solução de pulverização foi preparada adicionando a dose do fungicida em um recipiente com 1 L de água deionizada, completado para 2 L e agitado para garantir a diluição completa. Para avaliar o efeito do tamanho da gota na contaminação das abelhas, as aplicações foram feitas usando bicos de pulverização que produziam gotas finas (bico de pulverização de jato plano Spraying System Extended Range - XR110015 Teejet®) ou gotas grossas (bico de pulverização de jato plano Spraying System Air Induction Extended Range - AIXR110015Teejet®), com

uma pressão de 200 kPa, mantida a uma altura de 0,50 m acima do topo das plantas. 50 m acima do topo das plantas. O aparelho de pulverização se movia sobre trilhos a uma velocidade constante de 4 km.h⁻¹, para permitir a sobreposição ideal do jato de pulverização.

2.2.3 Coleta de abelhas após a pulverização e determinação dos níveis de exposição por meio do contato com os três princípios ativos do fungicida em avaliação

Quinze minutos após a aplicação do fungicida, foram coletadas amostras de 30 abelhas sem ferrão, com quatro repetições para cada tratamento, totalizando 960 abelhas sem ferrão. O experimento foi conduzido em um delineamento fatorial (duas posições nas plantas e dois tamanhos de gotas). O número de abelhas por amostra foi previamente definido, considerando o peso médio por abelha ($17,2 \pm 2,1$ mg/abelha sem ferrão) e a disponibilidade das abelhas, com o objetivo de utilizar um mínimo de 300 mg de abelhas/amostra. Amostras de >100 abelhas vivas foram previamente recolhidas e pesadas para determinar o peso médio.

As abelhas foram retiradas das plantas sem as contato direto com as mãos. Para isso, um tubo Falcon de 50 ml foi colocado abaixo da abelha e, em seguida, o alfinete do inseto foi puxado para baixo (Figura 3). Desta forma, cada abelha caiu num tubo com outras abelhas do mesmo tratamento. Utilizamos máscaras filtrantes adequadas e luvas de nitrilo descartáveis para evitar a exposição aos agrotóxicos e a contaminação das amostras. Os grupos controle foram constituídos por abelhas colhidas diretamente nas colônias, sem estarem afixadas nas plantas pulverizadas. Após a coleta, os tubos etiquetados foram conservados num ultracongelador a -80°C.



Figura 3. Coleta das abelhas sem ferrão após 15 minutos da aplicação do fungicida.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Foram adquiridos padrões (Sigma) dos três p. a. (bixafem, protioconazol e trifloxistrobina) que compõem o fungicida comercial de ação triplice para a construção de curvas-padrão. Estas foram utilizadas nas análises para determinar as quantidades destes componentes do fungicida nas abelhas que estavam nas plantas de algodão e soja pulverizadas com o fungicida. Um sistema (Shimadzu Prominence-I LC-2050) de cromatografia líquida (HPLC) de alta resolução equipado com um aparelho Zorbax EclipsePlus C18 2. 1 × 100 mm coluna de 3,5 μm a uma temperatura de 35°C foi utilizado para avaliar a quantidade de cada componente fungicida nas abelhas. A taxa de fluxo foi mantida a 0,6 mL min⁻¹, e a detecção foi realizada em um detetor UV-Vis a 210 nm.

As fases móveis utilizadas foram: (A) ácido fosfórico 0,1 M e (B) acetonitrila em modo gradiente. O tempo de retenção, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) dos três p. a. (Mesquita et al., 2013; Serafim et al, 2021) foram

determinados e observados em relatórios gerados por regressão linear feita com o software LabSolution (Shimadzu) para o sistema HPLC, conforme segue: para o protioconazol, o tempo de retenção determinado foi de 4,303 min, com LD e LQ de 0,75 e 2,26 µg/mL, respectivamente; para o bixafem, o tempo de retenção foi de 5.369 min, com LD e LQ de 0,47 e 1,42 µg/mL, respectivamente e, por fim, para a trifloxistrobina, o tempo de retenção foi de 12,679 min, com LD e LQ de 0,80 e 2,43 µg/mL, respectivamente.

Após a validação dos testes para determinação dos tempos de retenção dos p. a., as amostras de abelhas foram secas em liofilizador LioBras, modelo Liotop K107, por um período de 24 horas. Após a secagem, as amostras foram submetidas a processos de extração e *clean-up*, utilizando o método QuEChERS modificado (Rahman et al., 2022): foram adicionados 5 mL de acetonitrilo, 0,16 g de MgSO₄, 0,04 g de NaCl, 0,04 g de citrato de sódio tribásico di-hidratado (SCTD) e 0,02 g de sódio dibásico sesqui-hidratado (SCDS) para a extração de uma amostra contendo 30 abelhas. Para a limpeza, foram utilizados 15,3 mg de MgSO₄, 2,6 mg de amina primária secundária (PSA) e 6,3 mg de C18.

2.2.4 Análises estatísticas

Para analisar a quantidade de p. a. às quais as abelhas foram expostas, utilizamos um esquema fatorial de dois fatores. Este desenho envolveu os fatores: tamanho da gota (fina e grossa) e altura da abelha colocada nas plantas (topo e meia altura), com quatro repetições com 30 abelhas. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, nos casos em que se observou um efeito significativo ($p < 0,05$), procedeu-se a comparações de médias entre pares utilizando o teste de Tukey, considerando que ambos os fatores do desenho são qualitativos. A dispersão dos dados foi determinada pelo erro padrão residual (SAS Institute, 2013).

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação dos princípios ativos na solução do fungicida e contaminação das abelhas no grupo de controle

Na avaliação da solução preparada para pulverização das plantas de algodão e de soja, os três p. a. foram detectados em concentrações de 0.621g de bixafem,

0.802g de protioconazol e 0.721g de trifloxistrobina por litro de solução. Nenhum dos p. a. foram detectados nas amostras de abelhas do grupo controle.

2.3.2 Contaminação de abelhas sem ferrão em plantas de soja

Nas abelhas que foram colocadas nas plantas de soja, o bixafem foi encontrado em maiores níveis em abelhas da parte superior da planta em comparação com aquelas fixadas em alturas médias ($p = 0.007$; Tabela 1). O p. a. protioconazol foi detectado apenas em duas amostras colocadas no topo das plantas de soja que foram pulverizadas com gotas grossas (Tabela 1). O p. a. trifloxistrobina foi detectado, sem diferença significativa na quantidade entre abelhas da altura superior ou da altura média de plantas de soja e entre aquelas pulverizadas com gotas finas ou grossas (Tabela 1).

O bixafem foi detectado em níveis significativamente mais altos em abelhas colocadas no topo da planta comparação com aquelas colocadas em altura média ($p = 0.007$; Tabela 1). O protioconazol foi detectado apenas em duas amostras de abelhas colocadas no topo das plantas de soja pulverizadas com gotas grossas. A trifloxistrobina foi detectada nas amostras analisadas, sem diferença significativa entre aquelas localizadas no topo ou meio das plantas de soja e entre aquelas pulverizadas com gotas finas ou grossas (Tabela 1).

2.3.3 Contaminação de abelhas sem ferrão em plantas de algodão

O bixafem foi detectado em níveis similares em abelhas colocadas no topo ou no meio das plantas de algodão e pulverizadas com gotas finas ou grossas (Tabela 1). O protioconazol foi detectado apenas em uma amostra de abelhas colocadas no topo das plantas de algodão pulverizadas com gotas finas (Tabela 1).

Em plantas de algodão, a trifloxistrobina foi detectada em maiores níveis em abelhas colocadas no topo das plantas comparado com aquelas colocadas no meio da planta ($p = 0.029$). O tamanho das gotas não afetou significativamente na quantidade de trifloxistrobina nas abelhas colocadas em plantas de algodão (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade observada de bixafem (Bix), protioconazol (Pro) e trifloxistrobina (Tri) ($\mu\text{g}/\text{indivíduo}$) em abelhas mandaguari em plantas de soja e algodão pulverizadas com fungicida comercial com três princípios ativos.

Efeitos		Soja			Algodão		
		Bix	Pro	Tri	Bix	Pro	Tri
Tamanho da gota	Fina	0,75	-	2,76	0,73	-	0,62
	Grossa	0,74	-	1,70	0,75	-	0,66
Altura na planta	Topo	0,77a ¹	-	2,38	0,76	-	0,69a
	Meia altura	0,72b	-	2,08	0,72	-	0,58b
Interação	Fina x Topo	0,78	-	3,23	0,75	0,56	0,70
	Grossa x Topo	0,76	0,55	1,54	0,77	-	0,68
	Fina x Meia altura	0,71	-	2,30	0,72	-	0,54
	Grossa x Meia altura	0,73	-	1,87	0,73	-	0,63
Erro padrão da média		0,01		0,69	0,02		0,04
Fontes de variação		Probabilidade					
Tamanho da gota		0,163		0,024	>0,200		>0,200
Altura na planta		>0,200		<0,001	0,117		0,029
Interação		>0,200		>0,200	>0,200		>0,200

¹As médias seguidas pela mesma letra para o mesmo efeito (tamanho da gota ou posição na planta ou uma interação entre esses fatores) para cada ingrediente ativo não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

2.4 Discussão

O método proposto para determinar os níveis de exposição dos p. a. de um fungicida comercial em abelhas foi provado ser viável. Vale a pena observar que os valores obtidos consideram a dose correta do fungicida, o uso de equipamento calibrado e condições ambientais apropriadas, com o objetivo de cumprir todas as recomendações agronômicas inerentes ao uso correto de agrotóxicos. Acreditamos que esses critérios são essenciais para a avaliação da exposição à fungicidas ou outros agrotóxicos. De outro modo, pode haver dúvidas se a exposição observada foi influenciada por fatores que devem ser seguidos fielmente por aqueles que aplicam agrotóxicos. Entretanto, mesmo seguindo todos os protocolos de aplicação de agrotóxicos, a variação na exposição aos p. a. observada provavelmente ocorreu porque o produto avaliado é uma suspensão concentrada, resultando em uma distribuição heterogênea dos p.a. sobre as abelhas afixadas na área marcada. Isso é um indicativo do que pode acontecer no campo, mesmo observando-se protocolos de aplicação.

O produto comercial utilizado, de acordo com o rótulo, contém 125 g.L^{-1} de

bixafem, 175 g.L^{-1} de protioconazol e 150 g.L^{-1} de trifloxistrobina. Teoricamente, ao diluir 0,5 L desse produto em 144 L de solução em spray (diluição utilizada neste estudo), a solução deve conter $0,434 \text{ g.L}^{-1}$ de Bixafem, $0,608 \text{ g.L}^{-1}$ de protioconazol e $0,521 \text{ g.L}^{-1}$ de trifloxistrobina. Todos os três p. a. foram detectados na solução de pulverização usada em proporções semelhantes às descritas no rótulo. No entanto, a concentração equivalente observada na solução de cada p.a. excedeu a concentração teórica e pretendida em 43%, 31,9% e 38,4%, para bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, respectivamente.

Este produto a base de bixafem, protioconazol e trifloxistrobina é classificado pelo fabricante como uma suspensão concentrada (Bayer, 2019). Uma suspensão é uma mistura heterogênea, com uma ou mais substâncias sólidas dispersas que não estão igualmente distribuídas em um determinado líquido (Atkins et al., 2016). Devido a essa instabilidade, a segregação tende a ocorrer com o passar do tempo, sob a influência da gravidade, tanto na embalagem original quanto no tanque de pulverização, mesmo quando o produto é diluído (Luckham, 1989); isso pode afetar a quantidade de p.a. que chega às plantas.

Em nosso estudo, a embalagem do produto foi minuciosamente agitada antes da coleta de cada amostra. Além disso, as soluções do tanque do pulverizador foram agitadas imediatamente antes de cada aplicação. No entanto, considerando as características químicas do produto em avaliação, também podem ocorrer variações no campo, mesmo quando as recomendações são cuidadosamente seguidas na preparação da solução (Hazra e Purkait, 2019). Esse problema pode ser minimizado se o sistema de agitação da solução do pulverizador estiver disponível e ligado durante todo o processo de pulverização.

Embora o protioconazol tenha sido o p.a. com a maior concentração no fungicida, ele foi observado em quantidades menores nas amostras de abelhas. A solubilidade do protioconazol é influenciada pelo pH da água. Em um pH de 8,0, a solubilidade é de $0,3 \text{ g p.a. L}^{-1}$ de solução (IBAMA, 2019). Em nosso experimento, o pH da água usada foi de 7,8. Assim, teoricamente, a solução apresentou $0,608 \text{ g p.a. L}^{-1}$ de solução, considerando a diluição utilizada de acordo com as instruções do produto comercial. Portanto, o dobro da quantidade de protioconazol foi capaz de ser solubilizado na água, o que pode explicar sua distribuição não uniforme.

Como o protioconazol é muito instável no meio ambiente, ele pode ser rapidamente convertido em protioconazol-destio, seu principal metabólito, depois que a superfície exposta ao agrotóxico seca (Haas; Justus, 2004). Em nosso estudo, as abelhas foram coletadas após o tempo necessário para que as folhas e flores pulverizadas secassem.

O p. a. trifloxistrobina foi detectado em todas as amostras de abelha, com quantidades maiores em comparação com os outros p. a., exceto para o bixafem em abelhas colocadas em plantas de algodão. A detecção de quantidades maiores de trifloxistrobina pode ser explicada por sua alta estabilidade, mesmo após a absorção pelas plantas (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2017).

A avaliação da área da superfície corporal da abelha pode ser uma variável relevante a ser considerada em estudos futuros. A pilosidade e o formato do corpo são outras características que podem afetar a exposição das abelhas aos fungicidas. Isso poderia ser um fator para a forma como os agrotóxicos afetam as inúmeras espécies de abelhas sem ferrão que são muito menores do que a *Scaptotrigona postica*.

Na avaliação da contaminação das abelhas colocadas nas plantas de soja, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis altura de posicionamento das abelhas nas plantas e tamanho da gota de pulverização, exceto para o bixafem, pois foi observada uma quantidade maior de bixafem nas abelhas colocadas no topo das plantas. Nas plantas de algodão, a contaminação das abelhas com bixafem e trifloxistrobina foi maior na parte superior das plantas do que no meio.

As abelhas visitam as flores e outras estruturas que liberam exsudatos açucarados, mas também costumam descansar brevemente nas folhas (Thompson, 2010). No caso do algodão, as abelhas coletam néctar das flores e dos nectários extraflorais, que estão nas folhas (Rhodes, 2002). Portanto, colocamos as abelhas em partes das plantas onde elas são comumente encontradas para obter informações sobre a contaminação das abelhas em situações realistas de interação com as plantas.

Houve uma tendência de maior contaminação quando as abelhas estavam nas partes superiores das plantas, principalmente nas plantas de algodão. Essa maior contaminação das abelhas posicionadas na parte superior das plantas se deve ao fato

de que mais produto atinge essas folhas, conforme observado por Prado et al. (2019), que encontraram níveis mais altos de deposição nas folhas superiores das plantas de soja (69%), seguidas pelas partes intermediárias (22%) e inferiores (9%), em ensaios de pulverização controlada. O equipamento de pulverização que eles usaram foi semelhante ao que usamos em nosso estudo.

Com relação ao tamanho das gotas, a tendência foi as abelhas serem contaminadas com mais fungicida quando utilizado bicos de aplicação que produziam gotas finas. Para o mesmo volume, à medida que o tamanho das gotas diminui, o número de gotas geradas aumenta e, consequentemente, o potencial de cobertura da pulverização aumenta (Guler et al., 2012), aumentando as chances das gotas atingirem o inseto.

Os estudos sobre o impacto dos agrotóxicos na saúde das abelhas geralmente não incluem dados precisos sobre as doses dos produtos que realmente afetam essas espécies não-alvo quando são aplicados nas culturas, mesmo supondo que todas as recomendações agronômicas relativas aos equipamentos de aplicação e às condições ambientais sejam seguidas (Dhananjayan et al., 2019). Além disso, a estimativa do risco de contaminação de espécies não visadas tende a ser imprecisa porque a maneira como os agrotóxicos são realmente usados na agricultura muitas vezes tende a não refletir as recomendações agronômicas. A contaminação letal das abelhas pode ocorrer devido à aplicação incorreta e não recomendada de agrotóxicos (Wauchope, 2022).

Os critérios usados para calcular as doses críticas nos estudos de toxicologia das abelhas podem não refletir a realidade no campo. As concentrações de agrotóxicos consideradas ambientalmente relevantes são determinadas a partir de doses observadas em amostras de abelhas e produtos apícolas contaminados; no entanto, os agricultores nem sempre seguem fielmente as recomendações agronômicas para a aplicação de agrotóxicos, adotando doses de agrotóxicos e métodos de aplicação diferentes daqueles recomendados pelos agrônomos (Straw et al., 2023; Wauchope, 2022).

Os agrotóxicos devem ser aplicados quando houver pouco vento; condições climáticas inadequadas no momento da aplicação podem afetar a distribuição do agrotóxico na cultura-alvo (Bish et al., 2020). Além disso, o cálculo de doses subletais

com base em testes de toxicidade aguda pode não ser suficientemente informativo para avaliar o possível dano às abelhas, pois a dose testada em laboratório pode ser bem diferente das doses que contaminam esses insetos benéficos no campo. Portanto, talvez seja necessário revisar o conceito de dose ambientalmente relevante.

Para calcular a exposição por contato durante a aplicação foliar usando o modelo BeeREX, é usada uma proporção de 2,4 µg de p.a. por abelha para cada kg de p. a. por hectare tratado. Esse valor foi observado por Koch e Weisser (1997) como o máximo em que um traçador fluorescente foi aplicado em pomares de maçã e campos de *Phacelia* durante a floração, na presença de abelhas forrageiras. Observamos a exposição por contato das abelhas com 1 a 9 µg de cada p. a. usando 0,089 a 0,2076 p. a. kg/ha, conforme determinado pela análise química da solução aplicada. Dados os valores de nosso estudo e os do método preconizado, consideramos que um único valor pode não ser representativo e usado como base para todos os p. a.

A toxicidade dos produtos químicos agrícolas para as abelhas é normalmente avaliada por testes agudos orais e de contato (OECD, 1998a, 1998b) e exposição crônica de larvas (OECD, 2016) e adultos (OECD, 2017). Na avaliação de risco, esses pontos finais são empregados posteriormente para calcular o quociente de perigo usando uma taxa de aplicação no campo recomendada pelo fabricante. No entanto, determinar a dose à qual o inseto pode ser exposto no campo é crucial para a análise de risco. É a partir da dose de exposição que serão feitas as inferências sobre o risco ambiental do agrotóxico (Carreck; Ratnieks, 2014).

Quanto às limitações do nosso estudo, a solubilidade relativa de cada um dos três p. a. e o fato de que o fungicida comercial avaliado é uma suspensão concentrada que é difícil de manter completamente misturada podem ter contribuído para a distribuição heterogênea dos p. a. detectados nas abelhas. No entanto, é importante observar que seguimos as recomendações agrônomicas para o uso de fungicidas. Os testes de sala de pulverização aqui apresentados visam a contribuir para a determinação das doses que podem afetar as abelhas por contato. Para aplicar esse método para inferir a dose letal por contato, em substituição ao método atualmente recomendado (OECD, 1998b), seria necessário alterar a forma como as abelhas são fixadas às plantas, para que não sejam danificadas.

2.5 Conclusão

A exposição das abelhas tende a ser maior quando elas estão visitando as partes superiores das plantas no momento da aplicação e quando são usados bicos que produzem gotículas finas. O método de pulverização controlada que foi aplicado nesta pesquisa pode ajudar a estimar a quantidade de agrotóxico que contamina as abelhas nativas por contato ao aplicar o agrotóxico de acordo com as recomendações agronômicas.

Referências

Artz DR, Pitts-Singer TL (2015) Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. **Journal of Insect Science** 15:95. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jisesa/iev079>>

Atkins P, Overton T, Rourke J, Weller M, Armstrong F (2016) **Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry**. 6th ed. Oxford: Oxford University Press. 928 p.

Bayer (2019) **Fox Xpro Fungicide**. Bayer Crop Science. Disponível em: <<https://www.bayercropscience.com>>

Belsky J, Joshi NK (2020) Effects of fungicide and pesticide chemical exposure on apis and non-apis bees. **Current Opinion in Insect Science** 34:104-111. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.12.005>>

Bish M et al. (2020) Reducing the off-target movement of dicamba: A review of basic principles and field research. **Weed Technology** 34:16-27. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/wet.2019.78>>

Brenet A et al. (2021) Multifactorial effects of pesticides on pollinators: A review of interactions between pesticides and intrinsic factors of bees. **Science of The Total Environment** 772:145531. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145531>>

Carneiro MP, Malaspina O, Roat TC (2020) Influence of fungicides on survival and mitochondrial activity of honey bees. **Environmental Pollution** 258:113757. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113757>>

Carreck NL, Ratnieks FLW (2014) The dose makes the poison: Have "field realistic" rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? **Journal of Apicultural Research** 53:607-614. Disponível em: <<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.08>>

Cizelj I et al. (2016) Impacts of pesticides on honey bee immune system. **Apidologie** 47:574-588. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0420-4>>

DeGrandi-Hoffman G et al. (2015) The effects of pesticides on queen rearing and virus transmission in honey bees. **PLOS ONE** 10:e0122341. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122341>>

Dekker J (1995) The fungicide resistance problem. **Pesticide Science** 43:137-143. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.2780430204>>

Dhananjayan V et al. (2019) Conventional methods of pesticide application in agricultural field and fate of the pesticides in the environment and human health. In: Rakhimol KR et al. (eds) **Controlled release of pesticides for sustainable agriculture**. Berlin: Springer, p.1-40.

EFSA (2017) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance trifloxystrobin. **EFSA Journal** 15:e04845. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4845>>

Feng X et al. (2022) Effects of pesticide mixtures on honey bee behavior. **Environmental Science & Technology** 56:1230-1240. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05535>>

Ghini, R.; Kimati, H. (2000). **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002 . 78p. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/13231>>

Hazra A, Purkait MK (2019) **Process intensification in chemical engineering: Design, optimization, and applications**. Boca Raton: CRC Press. 482 p.

IBAMA (2019) **Relatório técnico sobre o protioconazol**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente.

IBAMA (2020) **Relatório anual de comercialização de agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente.

Koch H, Weisser P (1997) Exposure of honeybees during pesticide application under field conditions. **Apidologie** 28:439-447. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:19970610>>

Kubik M et al. (1999) Residues of pesticides in bee products from Poland. **Apidologie** 30:521-532. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido:19990607>>

Lucas JA et al. (2015) The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology** 90:29-92. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>>

Luckham PF (1989). The physical stability of suspension concentrates with particular reference to pharmaceutical and pesticide formulations. **Pesticide science** 25(1):25-34. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.2780250105>>

NHBHSCC (2012) **Report on the National Stakeholders Conference on Honey Bee Health**. Washington: USDA.

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, et al. (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees **Environmental Toxicology and Chemistry** 39:1267–1272. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4719>>

Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC et al. (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry** 33(9):2070-2075. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.2655>>

Prado E et al. (2019) Deposição de defensivos agrícolas em diferentes partes da planta de soja. **Revista de Agricultura Brasileira** 54:347-355.

Rhodes JW (2002) Cotton nectar: Its production and significance to cotton insects. **Australian Journal of Entomology** 41:203-209. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2002.00295.x>>

Rondeau S, Raine NE (2024) 2024Single and combined exposure to ‘bee safe’ pesticides alter behaviour and offspring production in a ground-nesting solitary bee (*Xenoglossa pruinosa*). **Proc. R. Soc. B.** 291:20232939. Disponível em: <<http://doi.org/10.1098/rspb.2023.2939>>

Rosa AS et al. (2015) Bee pollinators of Brazilian cultivated plants and the contribution of wild species to agriculture. **Pollination Ecology** 2:59-72.

SAS Institute (2013) **SAS/STAT 9.4 User's Guide**. Cary: SAS Institute. 8624 p.

Straw EA et al. (2023) Sublethal pesticide exposure, food stress and their impacts on bee health. **Science of the Total Environment** 893:164664. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164664>>

Tadei, R., Domingues, C. E. C., Malaquias, J. B., et al. (2019). Efeito tardio da coexposição larval ao inseticida clotianidina e ao fungicida piraclostrobina em *Apis mellifera* africanizada. **Scientific Reports**, 9, 3277. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>

Thompson HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and "new issues." **Pest Management Science** 66:1157-1162. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.1994>>

Wauchope RD (2022) Impact of environmental conditions on pesticide efficacy and off-target movement. **Journal of Environmental Science and Pollution Research** 29:12345-12356.

Zhang H (2018) The overlooked risk of fungicides for pollinator health. **Trends in Ecology & Evolution** 33:785-788. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.08.004>

CAPÍTULO 3 – Preferência e influência da suplementação proteica no desenvolvimento de colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*

RESUMO – A suplementação alimentar é uma alternativa importante para a manutenção da saúde e desenvolvimento de colônias de abelhas em períodos de escassez de recursos naturais. Este estudo avaliou a preferência alimentar e os efeitos dos suplementos nutricionais fermentados em colônias de *Scaptotrigona postica*. Os suplementos testados, compostos por levedo de cerveja, proteína isolada de soja, açúcar, pão de abelhas melíferas ou saburá de *S. postica*, além de água ou leite de soja, foram fermentados a 28°C e 70% de umidade por sete dias. Todas as dietas foram consumidas de maneira equivalente, indicando que o pão de abelhas pode substituir o saburá, promovendo fermentação eficiente e boa aceitação pelas abelhas. A inclusão do leite de soja não reduziu o consumo e pode agregar valor nutricional à formulação. Durante 13 semanas, 10 colônias foram monitoradas, com metade recebendo semanalmente 20 g de suplementação e a outra metade sem suplementação. O peso das colônias, a área dos discos de cria e o peso das abelhas prestes a emergir foram avaliados. Houve diferença significativa no peso das colônias entre os grupos ($p = 0,016$ para o grupo sem suplementação e $p = 0,027$ para o grupo suplementado). As abelhas de colônias suplementadas apresentaram médias de peso vivo (18,34 mg) e peso seco (3,88 mg) superiores aos do grupo controle (16,15 mg e 3,37 mg, respectivamente), embora a relação média de peso seco:peso vivo tenha se mantido estável. Os resultados destacam os benefícios da suplementação proteica no desenvolvimento individual das abelhas, mesmo sem influenciar diretamente o estoque alimentar das colônias. Entretanto, é essencial garantir a procedência do pão de abelhas melíferas, pois materiais contaminados podem disseminar doenças, comprometendo a saúde das colônias. Assim, o uso de suplementos proteicos fermentados, especialmente com pão de abelhas de origem confiável, é uma estratégia eficaz para melhorar o desempenho de *S. postica* em períodos de escassez alimentar.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão, alimentação suplementar, consumo de alimento, Meliponíneos, parâmetros biométricos

CHAPTER 3 – Preference and influence of protein supplementation on the development of *Scaptotrigona postica* bee colonies

ABSTRACT – Food supplementation is an important alternative for maintaining the health and development of bee colonies during periods of scarcity of natural resources. This study evaluated food preference and the effects of fermented nutritional supplements on *Scaptotrigona postica* colonies. The tested supplements, consisting of brewer's yeast, soy protein isolate, sugar, honey bee bread or *S. postica* suet, as well as water or soy milk, were fermented at 28°C and 70% humidity for seven days. All the diets were consumed in an equivalent way, indicating that bee bread can replace saburá, promoting efficient fermentation and good acceptance by the bees. The inclusion of soy milk did not reduce consumption and could add nutritional value to the formulation. For 13 weeks, 10 colonies were monitored, with half receiving 20g of supplementation every week and the other half receiving no supplementation. The weight of the colonies, the area of the brood disks and the weight of the bees about to emerge were evaluated. There was a significant difference in colony weight between the groups ($p = 0.016$ for the non-supplemented group and $p = 0.027$ for the supplemented group). Bees from supplemented colonies had higher average live weight (18.34 mg) and dry weight (3.88 mg) than the control group (16.15 mg and 3.37 mg, respectively), although the average dry weight:live weight ratio remained stable. The results highlight the benefits of protein supplementation for individual bee development, even without directly influencing the colonies' food stock. However, it is essential to guarantee the origin of honey bee bread, as contaminated materials can spread diseases, compromising the health of the colonies. Thus, the use of fermented protein supplements, especially with bread from bees of reliable origin, is an effective strategy for improving the performance of *S. postica* in periods of food shortage.

Keywords: Biometric parameters, food consumption, Meliponíneos, stingless bees, supplementary feeding,

3.1 Introdução

Uma estratégia essencial no manejo nutricional de abelhas é a suplementação proteica, particularmente em períodos de escassez de recursos florais, quando as fontes naturais de pólen se tornam insuficientes para atender às demandas metabólicas das colônias (Roubik, 1995; Michener, 2007). Entre as abelhas sem ferrão, a *Scaptotrigona postica* (abelha mandaguari) destaca-se por sua relevância ecológica e econômica em regiões tropicais. Entretanto, mudanças ambientais e a intensificação agrícola têm representado desafios significativos para essas colônias, impactando negativamente seu desenvolvimento e estabilidade (Venturieri, 2008; Klein et al., 2007). Nesse cenário, o manejo nutricional por meio da suplementação alimentar desponta como uma solução eficaz para mitigar os efeitos das adversidades ambientais e garantir o bom desempenho das colônias (Somerville, 2005).

A suplementação nutricional apresenta benefícios comprovados na saúde das colônias de *Apis mellifera*, promovendo o fortalecimento do sistema imunológico, a prevenção de doenças e o aumento da longevidade e vitalidade das abelhas (DeGrandi-Hoffman et al., 2010; Alaux et al., 2010). Esses efeitos tornam-se especialmente relevantes durante períodos de escassez floral, quando a oferta de pólen, principal fonte de proteínas, é insuficiente (Nogueira-Neto, 1997). Nessas circunstâncias, a deficiência nutricional pode comprometer o desenvolvimento das crias, reduzir a eficiência das operárias e desestabilizar a colônia como um todo (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Embora esses benefícios estejam bem documentados para *Apis mellifera*, faltam estudos específicos sobre a suplementação da dieta de abelhas sem ferrão. É provável que práticas de suplementação nutricional também ofereçam vantagens semelhantes para essas espécies, especialmente em períodos de escassez de recursos florais (Venturieri, 2008). Contudo, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esses efeitos e desenvolver protocolos adequados para as abelhas sem ferrão.

Os nutrientes essenciais para as abelhas incluem carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, que desempenham papéis fundamentais na saúde e no funcionamento das colônias. Os carboidratos fornecem energia para o forrageamento e a manutenção das funções vitais, enquanto as proteínas são indispensáveis para o

desenvolvimento das crias e a produção de geleia real (Pudasaini et al., 2020). Já os lipídios auxiliam na formação de cera e no metabolismo energético, e as vitaminas e minerais contribuem para o fortalecimento do sistema imunológico (Ferreira et al., 2018). Suplementos nutricionais bem formulados podem preencher essas lacunas, contribuindo para a manutenção da saúde e estabilidade das colônias frente aos desafios ambientais (Carvalho-Zilse, 2012). DeGrandi-Hoffman et al. (2010) além de investigaram os efeitos de suplementos proteicos na saúde das colônias de *Apis mellifera*, observaram as variações na aceitação desses alimentos pelas abelhas, o que indica a necessidade de ajustar as formulações para garantir sua eficácia.

Entre as ferramentas empregadas para avaliar a eficácia da suplementação proteica em colônias de abelhas nativas, destacam-se a medição do peso das colônias e a análise da área dos discos de cria. O peso da colônia é um indicador direto da saúde geral e do estoque de recursos, enquanto a área dos discos de cria reflete a capacidade reprodutiva e o crescimento da colônia (Venturieri, 2008; Brodschneider e Crailsheim, 2010). Estudos indicam que colônias suplementadas apresentam discos de cria maiores e peso mais estável, mesmo em condições adversas, evidenciando que a suplementação nutricional pode mitigar os efeitos negativos da escassez alimentar (Costa e Venturieri, 2009; Zangirolami e Junior, 2022).

A utilização de suplementos alimentares, como pólen conservado, levedura de cerveja e farinha de soja, tem sido objeto de diversas investigações como alternativas em períodos de escassez de recursos naturais. Camargo (1976) desenvolveu uma dieta semi-artificial para abelhas da subfamília Meliponinae, utilizando pólen de *Typha dominguensis* misturado com mel e saburá, que após fermentação mostrou-se eficaz na alimentação dessas abelhas. Costa e Venturieri (2009) avaliaram o impacto de diferentes dietas em operárias de *Melipona flavolineata*, concluindo que uma dieta à base de extrato de soja proporcionou desenvolvimento adequado das glândulas hipofaringeanas e dos ovócitos, sendo uma alternativa viável ao pólen natural. Penedo et al. (1976) investigaram o valor nutritivo de misturas de pólen com levedura de cerveja para *Scaptotrigona postica*, encontrando resultados satisfatórios no desenvolvimento das abelhas. Esses estudos indicam que suplementos como levedura de cerveja e farinha de soja podem ser utilizados na alimentação de abelhas sem ferrão durante períodos de escassez de recursos florais.

Embora a suplementação nutricional traga vantagens, ela não substitui os benefícios de uma dieta natural diversificada, que é obtida diretamente de flora com grande biodiversidade, que disponibiliza todos os nutrientes necessários para a manutenção das colônias a longo prazo (Vit et al., 2018). Assim, a suplementação deve ser considerada uma medida complementar, particularmente em cenários onde as condições ambientais limitam o acesso a recursos naturais, especialmente em épocas de escassez de alimentos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a preferência alimentar de *Scaptotrigona postica* por suplementos nutricionais proteicos fermentados, explorando a possibilidade de utilizar o pão de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) como uma alternativa viável ao saburá, e analisar os impactos da suplementação proteica fermentada no desenvolvimento das colônias de *S. postica*, com especial atenção ao tamanho da área dos discos de cria, peso das colônias e peso das abelhas prestes a emergir.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local do experimento e colônias de abelhas

O experimento foi realizado na UNESP, Câmpus de Dracena/SP, entre os meses de novembro de 2023 e fevereiro de 2024. O manejo alimentar foi conduzido entre os dias 3 de novembro de 2023 e 10 de fevereiro de 2024. Foram utilizadas 10 colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*, alojadas em colmeias modelo INPA com dimensões de 20 × 20 × 50 cm. Todas as colônias foram provenientes do Meliponário Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Dracena (Figura 1).

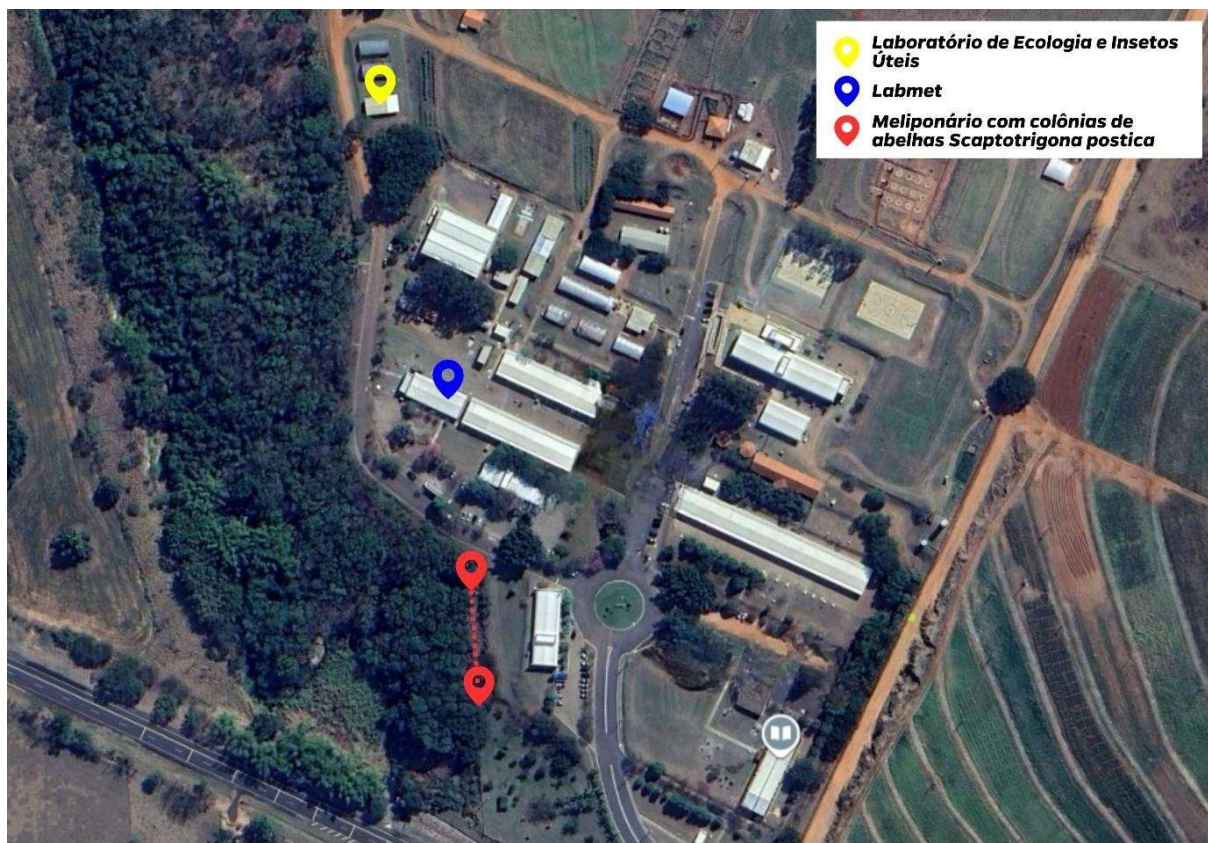


Figura 1. Área da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena, na qual foi instalado o meliponário experimental utilizado nesta pesquisa e os laboratórios onde foram realizadas as análises. Fonte: Google Maps.

3.2.2 Preparação do suplemento proteico e avaliação da preferencia para abelha *Scaptotrigona postica*

Foram elaborados quatro tipos de suplementos proteicos com composições específicas, detalhadas na Tabela 1. Cada suplemento continha 15 g de levedo de cerveja, 20 g de proteína isolada de soja e 20 g de açúcar, variando na adição de 5 g de pão das abelhas ou 5 g de saburá de *Scaptotrigona postica*, além de 40 ml de água ou leite de soja, conforme descrito.

Tabela 1. Composição dos suplementos proteicos utilizados no experimento para avaliar a preferência pelas abelhas *Scaptotrigona postica*.

Ingredientes	Suplementos			
	1	2	3	4
Açúcar (g)	20	20	20	20
Levedo de cerveja (g)	15	15	15	15
Proteína Isolada de Soja (g)	20	20	20	20
Pão das abelhas (g)	5	0	5	0
Saburá de <i>S. postica</i> (g)	0	5	0	5
Água (mL)	40	40	0	0
Leite de soja (mL)	0	0	40	40

Os ingredientes utilizados na elaboração dos suplementos proteicos foram obtidos de diferentes fontes. O pão de abelhas (*Apis mellifera*) foi coletado no dia da preparação, diretamente de um quadro de uma colônia saudável do apiário da UNESP de Dracena. Já o saburá (pólen armazenados por abelhas sem ferrão) foi obtido de duas colônias de *Scaptotrigona postica* do meliponário da mesma instituição, também coletado no dia da preparação. Em relação ao levedo de cerveja, proteína isolada de soja, e o leite de soja em pó foram adquiridos em uma loja de produtos naturais da cidade, garantindo padronização na qualidade dos ingredientes. O açúcar utilizado foi o açúcar cristal, e a água mineral foi fervida para preparação tanto da mistura como do leite de soja.

Para uma melhor homogeneização o polen ou saburá e o açúcar foram dissolvidos na parte líquida da mistura (água ou leite de soja), depois acrescentados aos poucos na mistura feita com os outros ingredientes, para evitar empelotamento. Após a mistura dos ingredientes os suplementos foram acondicionados em potes plásticos de 250 ml com tampa que continha pequenas aberturas na tampa para saída do gás e, permaneceram em câmara de germinação com temperatura (28°C) e umidade (70%) controladas por sete dias (Figura 2b e c).

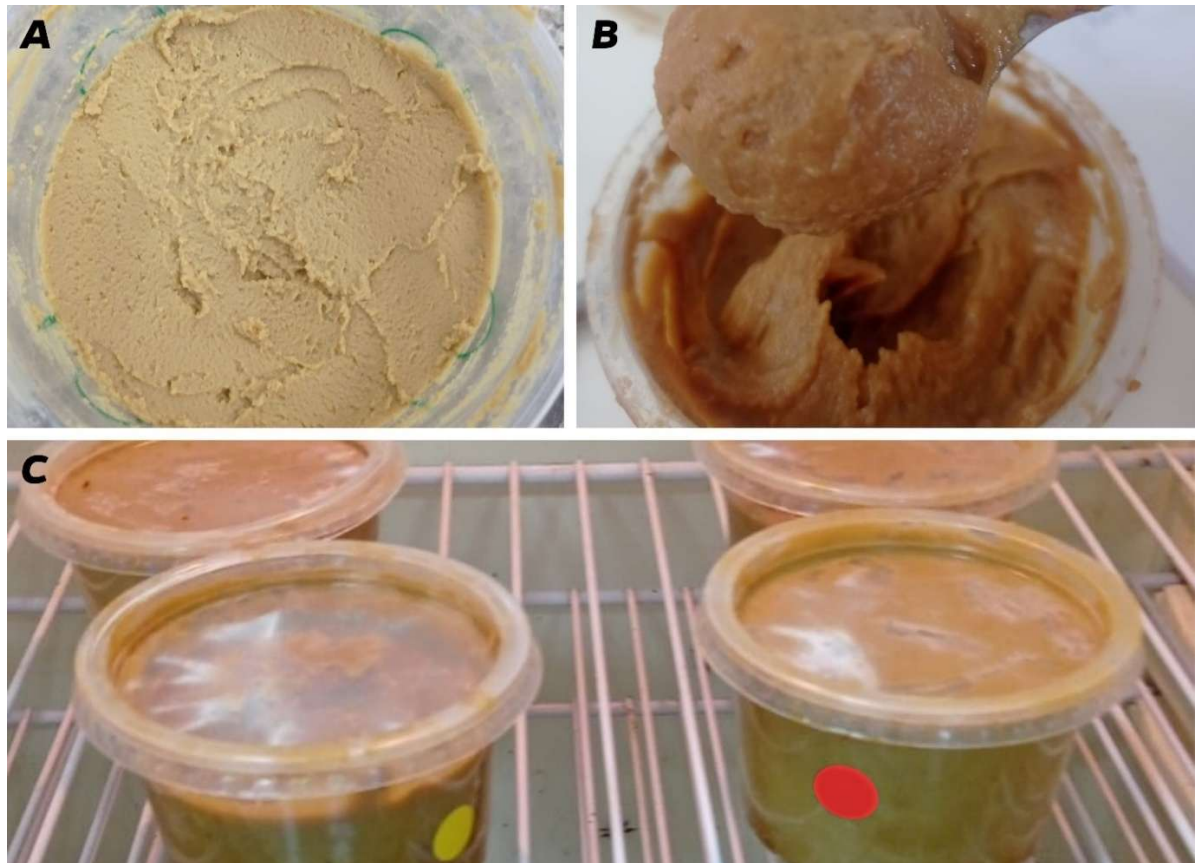


Figura 2. Ingredientes misturados e homogenizados antes do processo de fermentação (A) e após o processo fermentativo (B), as quatro mistura em câmara de germinação para fermentação (C). Fonte: Arquivo Pessoal.

Ao final do período de fermentação, os suplementos foram transferidos para pequenos alimentadores plásticos (Figura 3a), devidamente identificados e pesados, com o objetivo de avaliar a preferência das colônias. O experimento foi realizado com oito colônias de *Scaptotrigona postica*, que receberam simultaneamente os quatro tipos de suplementos proteicos, disponibilizados para consumo por um período de 24 horas (Figura 3b). Após esse intervalo, os alimentadores foram recolhidos, e as sobras de suplemento foram pesadas para determinar o consumo de cada tipo de suplemento.



Figura 3. Alimentadores plásticos coloridos de acordo com a cor identificada nas diferentes dietas (A) e o fornecimento simultâneo dentro das colônias de *Scaptotrigona postica* (B).

3.2.3 Avaliação do desempenho das colônias de *Scaptotrigona postica*

Já para análise do desempenho das colônias, 12 colônias do meliponário experimental foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo, composto por seis colônias, recebeu suplementação proteica elaborada com levedo de cerveja, proteína isolada de soja, açúcar, leite de soja e pão de abelha coletado de colônias de *Apis mellifera* do apiário da Unesp de Dracena. Os ingredientes foram misturados e acondicionados em potes plásticos de 250 ml com tampa perfurada, fermentados em ambiente controlado (28°C e 70% de umidade relativa) por uma semana. Cada colônia suplementada (CS) recebeu 20 g do suplemento proteico semanalmente, durante as 13 semanas de manejo alimentar. O segundo grupo de colônias não recebeu suplementação alimentar (grupo controle – SS). Ambos os grupos de colônias tiveram livre acesso ao campo para coleta de néctar, pólen, água e resinas.

O desempenho das colônias de *Scaptotrigona postica* foi monitorado

semanalmente por meio da pesagem da colmeia, que incluía tanto a caixa quanto a colônia. Todas as colônias estavam instaladas em caixas modelo INPA, com o mesmo peso inicial, garantindo condições padronizadas para o experimento. As medições foram realizadas com uma balança eletrônica digital de alta precisão, modelo Suryha, com capacidade máxima de 100 kg (Figura 4a), permitindo avaliações consistentes ao longo do período experimental.

A área do primeiro disco superior completamente formado foi utilizada como indicador adicional do desempenho das colônias. Para essa mensuração, foi utilizada uma régua de 20 cm e realizada sempre pela mesma pessoa, garantindo medições precisas e padronizadas (Figura 4b).



Figura 4. Pesagem das colônias de *Scaptotrigona postica* realizada com auxílio de balança eletrônica (A) e medição do segundo disco de cria com auxílio de uma régua (B). Fonte: Arquivo Pessoal.

Ao final das 13 semanas de experimento, foi realizada a coleta de discos maduros de cria em *Scaptotrigona postica* para análise do peso vivo e seco de abelhas adultas prestes a emergir. Foram retirados 10 discos maduro de cria das 12 colônias do meliponário, sendo desconsideradas duas colônias mais fracas de cada grupo alimentar, totalizando 10 discos de cria, sendo cinco de cada grupo alimentar. Esses discos foram cuidadosamente transportados em bandejas identificadas de acordo com o grupo alimentar até o laboratório.

No laboratório, as abelhas prestes a emergir foram coletadas diretamente dos discos com o auxílio de agulha esterilizada (Figura 5), para cada disco maduro, foram coletadas 10 abelhas, totalizando 100 indivíduos para a análise.



Figura 5. Coleta de abelhas adultas prestes a emergir, com agulhas esterilizadas, em quadros de cria maduros retirados das colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*. Fonte: Arquivo pessoal.

Foram coletadas 50 abelhas adultas prestes a emergir de cada grupo alimentar (SS e CS). Os indivíduos foram organizados em grupos de 10 e dispostos sobre papel filtro para a pesagem inicial. O peso vivo de cada grupo de 10 abelhas foi registrado utilizando uma balança analítica de alta precisão. O papel filtro contendo as abelhas foi transferido para potes plásticos com capacidade de 250 mL, equipados com tampas perfuradas para garantir a troca gasosa. Esses potes foram submetidos a um processo de anestesia em freezer, mantido a -18°C , por um período de 10 minutos. Após a confirmação da morte, cada grupo foi transferido para cadinhos previamente pesados em uma balança analítica de alta precisão.

Em seguida, os potes foram colocados em uma estufa com circulação de ar mantida a 105°C , permanecendo por 16 horas (AOAC, 1990). Após a secagem, os cadinhos foram retirados da estufa, estabilizados à temperatura ambiente e novamente pesados para determinar o peso seco.

3.2.4 Análises estatísticas

Para a análise de preferência dos suplementos avaliados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$), e, em caso de diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey para identificar eventuais diferenças.

Para avaliar o desempenho das colônias, utilizou-se a análise de regressão e análise de variância (ANOVA), sendo que as variáveis dependentes foram a área dos discos de cria, o peso das colônias e os pesos vivo e seco das abelhas recém-emergidas, enquanto as variáveis independentes incluíram o fornecimento de suplementação alimentar (grupo suplementado versus grupo sem suplementação) e o tempo (13 semanas) (SAS Institute, 2013).

3.3 Resultados

3.3.1 Preferência por suplementos nutricionais com diferentes ingredientes em colônias de abelhas mandaguari

Todos os suplementos foram parcialmente consumidos pelas abelhas, sem preferência significativa detectada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,5484$). O suplemento 1 apresentou valores de consumo variando entre 0,40 g (mínimo) e 6,80 g (máximo), enquanto o suplemento 2 variou de 0,47 g a 4,70 g. Já o suplemento 3 apresentou os maiores valores de consumo, variando de 0,36 g a 6,81 g, e o suplemento 4 registrou os menores valores, variando de 0,31 g a 3,03 g. Esses resultados indicam que, embora haja variação no padrão de consumo entre os suplementos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as dietas testadas, sugerindo que as abelhas não apresentaram preferência por nenhum dos suplementos oferecidos (Tabela 2).

Tabela 2. Consumo das dietas em gramas realizado pelas oito colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*, num período de 24 h.

Dietas	n	Consumo Médio (g)	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
1	8	1,97a ¹	2,32	0,40	6,80
2	8	1,53a	1,51	0,47	4,70
3	8	2,39a	2,38	0,36	6,81
4	8	1,13a	1,02	0,31	3,03

¹Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

3.3.2 Desempenho das colônias de *Scaptotrigona postica* que receberam ou não suplementação proteica

Durante as 13 semanas de manejo alimentar, observou-se uma variação linear significativa no peso das colônias de *Scaptotrigona postica* em ambos os grupos experimentais: sem suplementação proteica ($p = 0,016$) e com suplementação proteica ($p = 0,027$) (Figura 6), o que indica que há diferença estatisticamente significativa nos pesos das colônias ao longo do tempo dentro de cada grupo. O coeficiente angular do grupo suplementado (0.03754) foi 19x superior ao do controle (0.03149), evidenciando que a suplementação proteica não só aumentou o peso basal das colônias, mas também acelerou seu crescimento semanal ($p < 0.05$) (Figura 6).

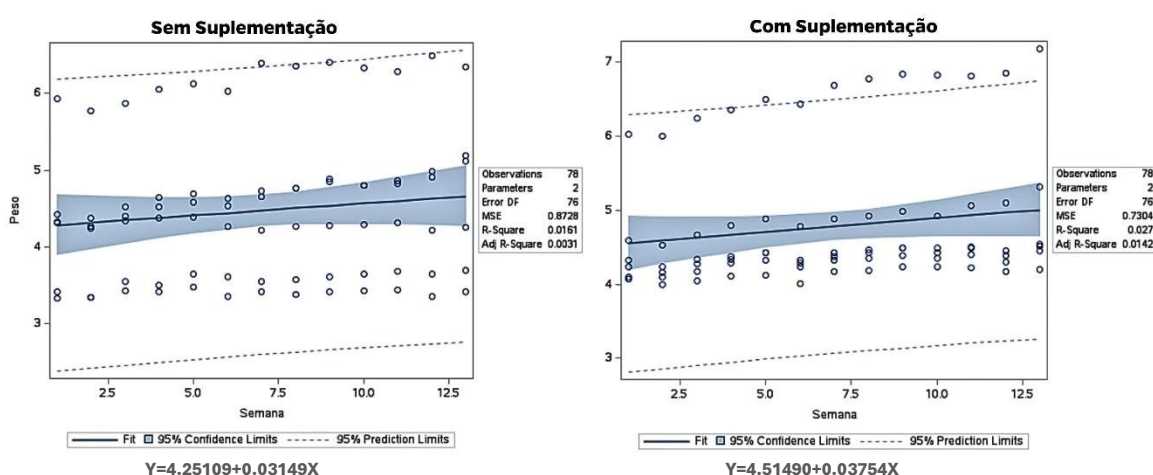


Figura 6. Evolução do peso das colônias de abelhas mandaguari (*Scaptotrigona postica*) ao longo de 13 semanas de manejo alimentar sem suplementação e com suplementação proteica.

Os resultados da área dos discos de cria ao longo de 13 semanas nas colônias de *Scaptotrigona postica* mostram um aumento progressivo tanto nas colônias sem suplementação proteica ($p=0,26$) quanto nas colônias com suplementação ($p=0,1287$). As linhas de regressão linear indicam tendências positivas em ambos os grupos, com coeficientes de determinação ajustados (R^2) de 0,2562 para o grupo sem suplementação e 0,1172 para o grupo suplementado (Figura 7). Esses dados sugerem que, embora tenha havido crescimento nos dois grupos, a suplementação não influenciou significativamente a expansão da área dos discos de cria, mas o grupo suplementado obteve uma média maior (52,64 cm²) em relação ao grupo sem suplementação (36,92 cm²).

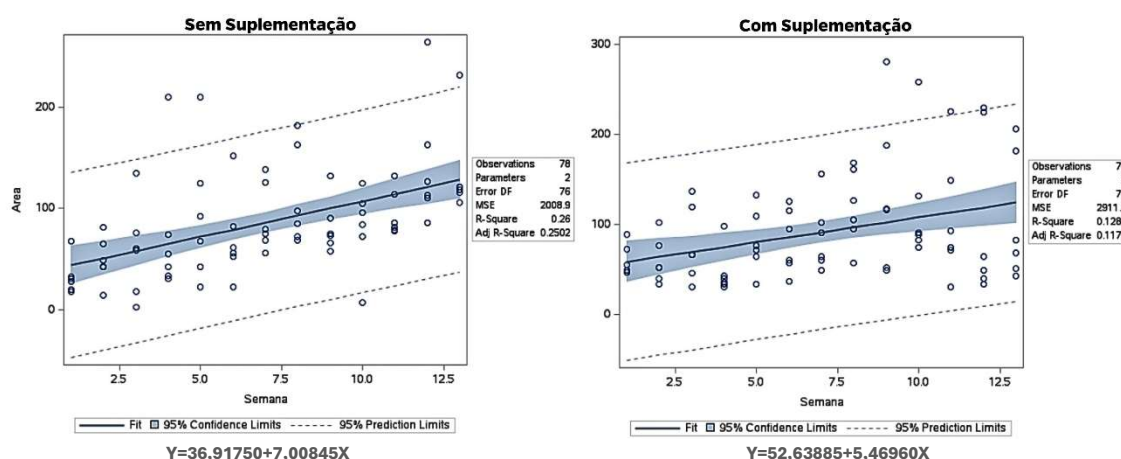


Figura 7. Evolução do área do segundo disco de cria das colônias de abelhas mandaguari (*Scaptotrigona postica*) ao longo de 13 semanas de manejo alimentar sem suplementação e com suplementação proteica.

As abelhas do grupo com suplementação (CS) apresentaram peso maior do que as do grupo sem suplementação (SS). Essa diferença foi significativa tanto para a avaliação do peso vivo quanto para o peso seco das amostras de abelhas.

Conforme apresentado na Tabela 3, as abelhas provenientes de colônias suplementadas (CS) exibiram peso vivo (16,15 mg) e peso seco (3,37 mg) menores em comparação às abelhas de colônias sem suplementação (SS), que registraram peso vivo de 18,34 mg e peso seco de 3,88 mg ($p < 0,010$). Essa diferença foi significativa tanto para o peso vivo quanto para o peso seco das amostras de abelhas. No entanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa na proporção entre peso seco e peso vivo entre os dois grupos em avaliação pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Peso vivo e peso seco (mg) e relação peso seco:peso vivo de abelhas mandaguari preta adultas ao emergir, obtidas de colônias com suplementação (CS) ou sem suplementação (SS).

Efeito		Peso Vivo (PV)	Peso Seco (PS)	PS:PV
Alimentação	CS	16,15a ¹	3,37a	0,21a
	SS	18,34b	3,88b	0,21a
Erro padrão		0,280	0,088	0,002
Valor de P		<0,010	<0,010	0,120

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Médias obtidas a partir de 10 indivíduos de abelhas oriundas de colônias do mesmo manejo nutricional.

3.4 Discussão

3.4.1 Preferência por suplementos proteicos em colônias de abelha mandaguari

Os resultados indicaram que as colônias de abelhas *Scaptotrigona postica* consumiram todas as dietas fornecidas de maneira equivalente, sem demonstrar preferência significativa, conforme evidenciado pela análise estatística ($p > 0,05$). Esse comportamento reforça a capacidade de adaptação alimentar das abelhas sem ferrão, que, de acordo com Menezes et al. (2013), podem apresentar aceitação de diferentes fontes alimentares devido à interação com microrganismos úteis em sua dieta. Esses microrganismos desempenham um papel fundamental no aproveitamento e digestão de nutrientes, contribuindo para a palatabilidade alimentar dessas abelhas, especialmente em cenários de escassez.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas, os valores absolutos revelaram variações no consumo entre os suplementos. O suplemento três apresentou o maior consumo total (19,17 g), enquanto o suplemento quatro teve o menor consumo (9,07 g). Essas diferenças podem ser atribuídas a fatores como palatabilidade e composição nutricional, que influenciam diretamente a aceitação de alimentos pelas abelhas. Além disso, o estágio de desenvolvimento das colônias pode ter desempenhado um papel relevante, já que colônias mais desenvolvidas geralmente apresentam maior demanda metabólica e reprodutiva, o que aumenta o consumo de alimentos (Venturieri, 2008).

A literatura destaca que a proporção de carboidratos e proteínas, além da

textura e sabor dos suplementos, são determinantes na aceitação de dietas pelas abelhas sem ferrão (Venturieri, 2008; Costa; Venturieri, 2009). Assim, a menor aceitação do suplemento quatro pode estar relacionada à sua composição específica, que pode ter sido menos atrativa ou menos adequada às necessidades das colônias no período avaliado. No entanto, a aceitação geral das dietas sugere que os suplementos fornecidos podem atender às necessidades básicas das colônias.

O uso do pão de abelhas melíferas como substituto do saburá demonstrou ser uma estratégia viável neste estudo, promovendo uma fermentação adequada e sendo amplamente aceito pelas abelhas. Contudo, é fundamental que o pão de abelhas seja proveniente de colônias saudáveis, uma vez que patógenos como *Nosema spp.* e vírus podem comprometer sua qualidade e representar riscos para a saúde das colônias suplementadas (Genersch, 2010). Materiais contaminados podem atuar como vetores de doenças, reforçando a necessidade de medidas rigorosas de controle sanitário na coleta e utilização desse ingrediente.

Adicionalmente, a inclusão do leite de soja nas dietas não impactou negativamente o consumo pelas colônias, sugerindo um valor nutricional agregado às formulações. Estudos indicam que dietas contendo leite de soja fermentado podem fornecer proteínas de alta qualidade e compostos bioativos, beneficiando o desenvolvimento das abelhas (Costa; Venturieri, 2009). A fermentação promovida tanto pelo pão de abelhas quanto pelo leite de soja pode aumentar a biodisponibilidade de nutrientes e reduzir compostos antinutricionais, favorecendo a aceitação e a eficácia da suplementação alimentar.

Esses achados corroboram os de Vollet-Neto et al. (2010), que destacou a viabilidade e eficácia econômica de dietas à base de extrato de soja fermentado como alternativas ao pólen natural. Além disso, Menezes et al. (2013) reforçam que ingredientes fermentados na dieta das abelhas sem ferrão podem melhorar a saúde das colônias devido à presença de microrganismos benéficos, que auxiliam no metabolismo de nutrientes e na proteção contra patógenos.

Por fim, os dados reforçam o grande potencial de adaptação alimentar de *Scaptotrigona postica*, uma característica essencial para a manutenção da saúde e produtividade das colônias. Cremonez et al. (1998) enfatizam que suplementos bem formulados são fundamentais para sustentar colônias em períodos de escassez,

garantindo sua sobrevivência e desenvolvimento. Assim, a combinação de fontes proteicas variadas com carboidratos fermentados e outros componentes atrativos representa uma estratégia eficaz para assegurar o desempenho de colônias sob condições adversas.

3.4.2 Comparação do desenvolvimento de colônias de abelhas mandaguari que receberam ou não suplementos nutricionais

O desempenho das colônias de *Scaptotrigona postica* ao longo das 13 semanas de manejo alimentar revelou uma variação significativa no peso das colônias em ambos os grupos experimentais: sem suplementação proteica ($p = 0,016$) e com suplementação proteica ($p = 0,027$). Apesar da significância estatística, a magnitude da variação foi pouca, sugerindo que a suplementação não gerou um impacto considerável no acúmulo de recursos alimentares. Esses resultados indicam que, embora o peso das colônias tenha variado ao longo do tempo, a suplementação proteica não contribuiu de forma expressiva para o incremento de peso total das colônias. O aumento progressivo observado na área dos discos de cria, portanto, parece estar mais associado ao desenvolvimento natural das colônias e ao manejo adotado, do que diretamente às reservas nutricionais adicionais fornecidas (Cremonez et al., 1998; Vollet-Neto, 2010).

O crescimento na área dos discos de cria, evidenciado pelas tendências lineares positivas em ambos os grupos ($R^2 = 0,2562$ para o grupo sem suplementação e $R^2 = 0,1172$ para o grupo suplementado), reflete a adaptação das colônias às condições de manejo alimentar. A suplementação não influenciou de maneira significativa a expansão dessa área ($p > 0,05$), reforçando que outros fatores, como a qualidade da flora local, a temperatura e a umidade, podem ter desempenhado papéis mais relevantes nesse processo (Nogueira-Neto, 1997). Além disso, a presença de microrganismos benéficos associados aos ninhos pode ter contribuído para o desenvolvimento reprodutivo, como sugerido por Menezes et al. (2015), que destacaram a influência positiva desses microrganismos na sobrevivência e desenvolvimento das crias em abelhas sem ferrão.

A suplementação proteica influenciou significativamente os pesos vivo e seco das abelhas recém-emergidas. As abelhas oriundas de colônias suplementadas

apresentaram pesos menores (16,15 mg para peso vivo e 3,37 mg para peso seco) em comparação às abelhas de colônias sem suplementação (18,34 mg para peso vivo e 3,88 mg para peso seco, $p < 0,010$). Contudo, a proporção peso seco:peso vivo foi equivalente entre os grupos (0,21), indicando que, apesar das diferenças nos valores absolutos, a composição corporal das abelhas permaneceu balanceada. Esses achados sugerem a necessidade de ajustar a composição das dietas suplementares para maximizar os benefícios nutricionais.

A palatabilidade das dietas suplementares também foi um fator relevante para o consumo e, conseqüentemente, para o aporte nutricional. Almeida Neto et al. (2015) enfatizam que a aceitação dos alimentos pelas abelhas depende diretamente de fatores como textura, sabor e valor nutricional. Assim, as diferenças nos pesos das abelhas podem ser atribuídas não apenas à suplementação proteica, mas à interação entre o valor nutricional e a atratividade das dietas. Além disso, Pires (2009) demonstrara que fontes proteicas alternativas, como extrato de soja fermentado, podem melhorar significativamente o valor nutricional das dietas, otimizando o desenvolvimento larval.

A suplementação proteica, portanto, se apresenta como uma estratégia promissora para favorecer o desenvolvimento de colônias de *Scaptotrigona postica*, especialmente em períodos de escassez de recursos naturais. Cremonez et al. (1998) investigaram a eficiência de dietas proteicas para abelhas *Apis mellifera*, enquanto Vollet-Neto et al. (2010) avaliou o desempenho de colônias da mesma espécie ao serem alimentadas com diferentes suplementos proteicos. Ambos os estudos demonstraram que dietas bem formuladas podem promover o nascimento de abelhas mais vigorosas e resistentes a condições adversas, além de contribuir para a longevidade das colônias e o aumento da produtividade. Esses resultados reforçam a importância de investir no aprimoramento de formulações nutricionais que atendam às necessidades específicas das colônias de abelhas sem ferrão e maximizem seu desempenho reprodutivo e produtivo (Nogueira-Neto, 1997; Pereira, 2005; Pires, 2009).

3.5 Conclusão

Conclui-se que o pão de abelhas melíferas pode ser utilizado como uma

alternativa eficiente ao saburá na formulação de suplementos proteicos fermentados para *Scaptotrigona postica*, garantindo fermentação adequada e boa aceitação pelas abelhas. A suplementação proteica influenciou significativamente o peso total das colônias e as abelhas provenientes de colônias suplementadas apresentaram peso vivo e seco superiores (18,34 mg e 3,88 mg, respectivamente) quando comparadas às do grupo controle (16,15 mg e 3,37 mg). Esses resultados destacam os benefícios da suplementação para o desenvolvimento individual das abelhas, reforçando sua importância como estratégia nutricional em períodos de escassez alimentar.

Referências

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters** 6(4):562-565. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>>

Almeida Neto JD, Santos FCJ, Oliveira FP, Silva RM, Ribeiro MDS (2015) Avaliação da atratividade de diferentes essências adicionadas à alimentação artificial energética de abelhas *Apis mellifera*. **Revista Científica de Agricultura e Meio Ambiente** 13(1):45-52. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7314937.pdf>>

AOAC (1990) **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15ª ed. Arlington: AOAC International.

Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. **Apidologie** 41(3):278-294. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido/2010012>>

Camargo CA (1976) Dieta semi-artificial para abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura** 28:430-431.

Carvalho-Zilse G, Nunes-Silva C (2012) Threats to the stingless bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. In: **Bees: Biology, Threats and Colonies**. p.147-168.

Costa L, Venturieri GC (2009) Diet impacts on *Melipona flavolineata* workers (Apidae, Meliponini). **Journal of Apicultural Research** 48(1):38-45. Disponível em: <<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.1.09>>

Cremonez TM, De Jong D, Bitondi MG (1998) Quantificação de proteínas da hemolinfa como um método rápido para testar dietas proteicas para abelhas (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology** 91:284-289. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/91.6.1284>>

DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology** 56(9):1184-1191. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017>>

Ferreira JCB, Queiroz ACM de, Andrade AA, Veiga JC (2018) Nutrição de abelhas sem ferrão: uma revisão sobre a alimentação proteica complementar como alternativa no período de escassez da Região Amazônica. In: **Anais do 22º Congresso Brasileiro de Apicultura e 8º Congresso Brasileiro de Meliponicultura**. Joinville: CBA. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1094564>>

Genersch E (2010) Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Applied Microbiology and Biotechnology** 87(1):87-97. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>>

Klein AM, Vaissière BE, Cane JH et al. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 274(1608):303-313.

Menezes C, Vollet-Neto A, Contrera FAFL et al. (2013) The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. p.153-171.

Michener CD (2007) **The Bees of the World**. 2ª ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Milfont MO et al. (2013) Higher soybean production using honeybee and wild pollinators. **Environmental Chemistry Letters** 11(4):335-341.

Nóbrega JP da, Silva MG, Sobreira EDA et al. (2018) Caracterização sensorial e físico-química de mel de *Apis mellifera* e xarope de glucose de milho comercializados no Rio Grande do Norte. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** 8(1):09. Disponível em: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/CVADS/article/view/6050>>

Nogueira-Neto P (1997) **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis.

Penedo MCT, Testa PR, Zucoloto FS (1976) Valor nutritivo do geval e do levedo de cerveja em diferentes misturas com pólen para *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura** 28:536-538.

Pereira FM (2005) **Desenvolvimento de rações proteicas para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e sua influência sobre a longevidade das operárias e desenvolvimento de colônias**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.

Piras B (2009) **Efeitos da alimentação artificial proteica sobre colônias de uruçucinzenta (*Melipona fasciculata* Smith, 1854)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão.

Pudasaini R, Dhital B, Chaudhary S (2020) Nutritional requirement and its role on honeybee: a review. **Journal of Agriculture and Natural Resources** 3:2661-6289.

Roubik DW (1995) **Pollination of cultivated plants in the tropics**. Roma: FAO. 208p.

SAS Institute (2013) **SAS 9.2 online documentation**. Cary: SAS Institute Inc.

Somerville D (2005) **Fat bees, skinny bees: a manual on honey bee nutrition for beekeepers**. Canberra: RIRDC.

Venturieri GC (2008) **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2ª ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 60p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/410121>>

Vit P, Pedro SR, Roubik DW (2018) Pot-pollen in stingless bee melittology. In: **Crop pollination by stingless bees**. p.139-153. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5>>

Vollet-Neto A, Maia-Silva C, Menezes C et al. (2010) **Dietas protéicas para abelhas sem ferrão**. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/880293/1/abelhassemferrao.pdf>>

Zangirolami M, Junior O (2022) Organização, necessidades nutricionais e suplementação artificial para abelhas *Apis mellifera*. **Research, Society and Development** 11(9). Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31453>>

CAPITULO 4 – Efeito da suplementação proteica na bioenergética mitocondrial de abelhas *Scaptotrigona postica* expostas à fungicidas de ação tripla

RESUMO - A produção de energia nas mitocôndrias é fundamental para o funcionamento metabólico da maioria dos seres vivos, incluindo as abelhas. Contudo, a exposição a certos xenobióticos pode implicar em diminuição da bioenergética mitocondrial destes insetos benéficos. Sugere-se que melhores condições nutricionais podem mitigar esses efeitos prejudiciais, favorecendo-se assim a saúde das abelhas. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da exposição por contato aos fungicidas bixafem, protioconazol, trifloxistrobina, isolados ou em mistura, na bioenergética mitocondrial do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*. Doze colônias desta espécie de abelhas nativas sem ferrão foram mantidas em condições controladas, diferindo-se pela suplementação alimentar das colônias de um grupo. A produção de energia mitocondrial em *Scaptotrigona postica* foi significativamente afetada pela exposição aos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, tanto isoladamente quanto em combinação. Os experimentos “in vitro” (0-150 μM) e “in vivo” (0,7 e 2,1 $\mu\text{g/abelha}$) revelaram que todos os tratamentos reduziram o consumo de oxigênio nos estados II e III da respiração, com inibições entre 40-70% nas concentrações mais altas (50-150 μM). A trifloxistrobina foi o composto mais impactante, seguido pela combinação dos três fungicidas, enquanto o bixafem apresentou efeitos menos pronunciados, porém ainda significativos. A concentração de ATP também foi reduzida em todos os tratamentos, atingindo quedas de até 60% nos casos mais severos. Abelhas de colônias sem suplementação nutricional mostraram maior sensibilidade, com reduções de 30-50% no consumo de oxigênio, contra 20-35% nas abelhas suplementadas. Embora a suplementação tenha atenuado os efeitos, não os eliminou completamente, mantendo diferenças significativas em relação aos controles. Os resultados indicam que os fungicidas comprometem a função mitocondrial, afetando diretamente os processos fisiológicos essenciais como voo, forrageamento e termorregulação. A combinação dos três princípios ativos não demonstrou efeito sinérgico, mas sim impactos aditivos. Esses achados destacam a importância de se considerar os impactos individuais dos fungicidas e suas interações, além de estratégias de manejo que minimizem os efeitos negativos sobre a saúde das abelhas.

Palavras-chave: Adenosina trifosfato, bixafem, *Meliponini*, mitocôndria, protioconazol, trifloxistrobina

CHAPTER 4 – Effect of protein supplementation on colony development and mitochondrial function in *Scaptotrigona postica* exposed to a triple action fungicide

ABSTRACT - The production of energy in mitochondria is fundamental to the metabolic functioning of most living beings, including bees. However, exposure to certain xenobiotics can lead to a decrease in mitochondrial bioenergetics in these beneficial insects. It is suggested that better nutritional conditions can mitigate these harmful effects, thus favoring bee health. This study evaluated the effects of contact exposure to the fungicides bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin, alone or in a mixture, on the mitochondrial bioenergetics of the thorax of *Scaptotrigona postica* bees. Twelve colonies of this species of native stingless bees were kept under controlled conditions, differing by the food supplementation of the colonies in one group. Mitochondrial energy production in *Scaptotrigona postica* was significantly affected by exposure to the fungicides bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin, both alone and in combination. The “in vitro” (0-150 μ M) and “in vivo” (0.7 and 2.1 μ g/bee) experiments revealed that all treatments reduced oxygen consumption in states II and III of respiration, with inhibitions of between 40-70% at the highest concentrations (50-150 μ M). Trifloxystrobin was the most impactful compound, followed by the combination of the three fungicides, while bixafem showed less pronounced but still significant effects. The ATP concentration was also reduced in all treatments, reaching drops of up to 60% in the most severe cases. Bees from colonies without nutritional supplementation showed greater sensitivity, with reductions of 30-50% in oxygen consumption, compared to 20-35% in supplemented bees. Although supplementation attenuated the effects, it did not eliminate them completely, maintaining significant differences compared to the controls. The results indicate that fungicides compromise mitochondrial function, directly affecting essential physiological processes such as flight, foraging and thermoregulation. The combination of the three active ingredients did not show a synergistic effect, but rather an additive impact. These findings highlight the importance of considering the individual impacts of fungicides and their interactions, as well as management strategies that minimize negative effects on bee health.

Keywords: Adenosine triphosphate, Bixafem, Meliponini, mitochondria, prothioconazole, trifloxystrobin

4.1 Introdução

A bioenergética mitocondrial é um processo essencial para a produção de energia nas células e desempenha um papel crucial na vida das abelhas. Essas atividades, como o voo por longas distâncias e manutenção da temperatura do ninho, exigem grande esforço metabólico, que é possível por meio da produção de ATP nas mitocôndrias, a principal fonte de energia celular (Lima, 2023). Estas organelas, responsáveis por esse processo, adaptam sua estrutura e funcionamento de acordo com o tipo de célula e o estado fisiológico do indivíduo, refletindo as necessidades energéticas específicas de cada situação (Fidelis et al., 2024; Ferraz, 2024). Assim, os processos respiratórios mitocondriais, como o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, são indispensáveis para garantir a produção de energia nos organismos (Lehninger et al., 2008).

A respiração mitocondrial ocorre em diferentes estados funcionais, conforme descrito por Chance e Williams (1955) em seu clássico modelo dos estados respiratórios. O estado II caracteriza-se pela presença de substratos respiratórios (como NADH ou succinato) na ausência de ADP, resultando em baixa taxa de consumo de oxigênio devido à limitação pelo acúmulo de gradiente de prótons. Já o estado III, induzido pela adição de ADP, representa a condição de fosforilação oxidativa ativa, com máxima taxa respiratória enquanto houver ADP disponível para a ATP sintase (Nicholls e Ferguson, 2013). Essa transição entre estados é fundamental para avaliar a eficiência do acoplamento mitocondrial e a integridade da cadeia respiratória.

Quanto aos complexos da cadeia respiratória, o complexo I (NADH desidrogenase) catalisa a oxidação de NADH com redução de ubiquinona, sendo sensível à inibição por rotenona, enquanto o complexo II (succinato desidrogenase) oxida succinato a fumarato, transferindo elétrons diretamente para a ubiquinona de forma independente do complexo I (Brandt, 2006). A avaliação isolada do complexo II, realizada através da inibição do complexo I com rotenona (2,5 μM), permite discriminar contribuições específicas de cada via eletrônica à respiração mitocondrial, como demonstrado em estudos clássicos de bioenergética (Kuznetsov et al., 2008).

Apesar da grande eficiência de produção de energia inerente às abelhas

sociais, fatores externos, como a exposição a poluentes e agrotóxicos, têm mostrado impactos prejudiciais sobre estes insetos (Nicodemo et al., 2020; Fidelis et al., 2024). Fungicidas, por exemplo, podem interferir diretamente no funcionamento das mitocôndrias, reduzindo a produção de ATP e comprometendo a saúde e a sobrevivência das colônias, uma vez que este é o principal modo de ação de alguns destes compostos (Alves et al., 2024; Freitas et al., 2024b; Ferraz, 2024).

Além dos efeitos dos agrotóxicos, a alimentação das abelhas desempenha um papel crucial em sua capacidade de resistência a fatores adversos. Quando há escassez de alimento no ambiente, as abelhas tornam-se mais vulneráveis e enfrentam maior dificuldade para lidar com desafios ambientais, incluindo a exposição a agrotóxicos (Naug, 2009; Barascou et al., 2021).

Entre os agrotóxicos, o fungicida comercial a base de bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina, tem sido associado a efeitos adversos sobre a saúde das abelhas (Pacífico da Silva et al., 2016; Alves et al., 2024). Estudos indicam que a exposição a esses compostos pode comprometer o metabolismo energético e a função mitocondrial, impactando negativamente o desempenho e a sobrevivência das colônias (Campbell et al., 2016; Rossi et al., 2020; Fidelis et al., 2024).

Segundo Alves et al. (2024), os riscos tornam-se ainda mais críticos quando a exposição ao fungicida ocorre em condições de restrição alimentar, pois a falta de nutrientes essenciais pode reduzir a capacidade das abelhas de mitigar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos. Dessa forma, a associação entre fatores ambientais adversos e agroquímicos potencializa os danos às populações de polinizadores, tornando fundamental a investigação de estratégias para minimizar esses impactos.

As abelhas sociais sem ferrão *Scaptotrigona postica*, popularmente chamadas de mandaguari, são amplamente distribuídas no Brasil, destacando-se como um modelo importante para compreensão dos impactos dos agrotóxicos e da escassez de alimento sobre a saúde das abelhas. Essa espécie possui um papel essencial na polinização e está diretamente ligada à produtividade agrícola e à conservação de diversas plantas nativas. Estudos indicam que a nutrição adequada desempenha um papel essencial na manutenção da saúde e na resiliência dessas abelhas, sendo um fator determinante para sua capacidade de enfrentar estresses ambientais, como a exposição a fungicidas. A oferta equilibrada de nutrientes não apenas fortalece o

sistema imunológico, mas também influencia diretamente o desenvolvimento, a longevidade e a resistência dessas abelhas aos impactos dos agrotóxicos (Menezes et al., 2015; Paludo et al., 2018).

No entanto, apesar de avanços no conhecimento sobre os efeitos de agrotóxicos e restrições alimentares, ainda há muito a ser descoberto sobre como esses fatores, especialmente em conjunto, afetam a bioenergética mitocondrial dessas abelhas. Diante disso, buscou-se investigar se a exposição aos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, isolados ou em mistura, pode se manifestar diferentemente na bioenergética mitocondrial de abelhas *Scaptotrigona postica* oriundas de colônias que tiveram ou não a alimentação suplementada.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local de realização das pesquisas e manejo das colônias de abelhas nativas

Foram utilizadas 12 colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*, mantidas em colmeias INPA com dimensões de 20x20x50 cm (modelo padrão do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2005), conforme descrito por Kerr et al. (adaptado para *Scaptotrigona spp.*). Antes da divisão dos grupos, as colônias foram avaliadas e receberam notas de 1 a 5, sendo 5 atribuído às colônias mais fortes. Em seguida, os dois grupos experimentais foram formados por seleção aleatória, porém equilibrada, considerando a distribuição dessas notas, a fim de evitar diferenças significativas entre os grupos.

As colônias foram alojadas no Meliponário Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Dracena. O período experimental ocorreu entre novembro de 2023 e junho de 2024, com o manejo alimentar iniciado em 04 de novembro de 2023 até 04 de maio de 2024, totalizando 26 semanas de suplementação.

O primeiro grupo, composto por seis colônias, recebeu suplementação proteica elaborada com 15 g de levedo de cerveja, 20 g de proteína isolada de soja, 20 g de açúcar, 40 ml de leite de soja e 5 g de pão de abelha coletado de colônias de abelhas melíferas do apiário da Unesp de Dracena. Os ingredientes foram misturados e acondicionados em potes plásticos novos de 250 ml com tampa perfurada (para saída

de gases), fermentando em câmara B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) sob condições controladas (28°C e 70% de umidade relativa) por uma semana.

A quantidade de 20 g semanais ofertada a cada colônia do grupo suplementado (CS) foi determinada por meio de observações preliminares do consumo, garantindo que não houvesse sobras de alimento que pudessem atrair inimigos naturais. Essa precaução foi especialmente crítica devido à abertura semanal das colônias para coleta de dados (área de disco de cria) e troca de recipientes alimentares. As outras seis colônias formaram o segundo grupo, que não recebeu suplementação alimentar (SS). Ambas as colônias tiveram livre acesso ao campo para coleta de néctar, pólen, água e resinas.

4.2.2 Substâncias químicas e dosagens

Foi adquirido os princípios ativos bixafem, protioconazol e trifloxistrobina da Sigma-Aldrich. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de alta pureza.

Na avaliação da respiração mitocondrial “in vitro” e da produconcentração de ATP, foram estabelecidas concentrações de 0, 10, 25, 50, 100 e 150 μM , considerando os três princípios ativos tanto isoladamente quanto em combinação. Para a avaliação da respiração mitocondrial “in vivo”, foram utilizadas duas doses de princípios ativos: 0,7 μg (dose 1) e 2,1 μg (dose 2) para 0,5 μl de metanol (Freitas et al., 2024a) tanto para os três princípios ativos isolados quanto em combinação, e apenas metanol para o grupo controle. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.3 Obtenção do homogenato do tórax de abelhas e dosagem de proteína

A coleta das abelhas era realizada com auxílio de potes plásticos (250 ml) perfurados e identificados pelo tipo de manejo alimentar, colocados na entrada da colônias, aplicando leves batidas na caixa para que as abelhas adultas saíssem e os potes eram tampados e recebiam nova identificação com número da caixa da colônia que haviam sido coletadas. Um cuidado foi de não misturar abelhas de outras colônias evitando ataques entre elas. Após coleta as abelhas foram anestesiadas a 4°C por aproximadamente 2 minutos e, em seguida, as mitocôndrias do tórax das abelhas adultas eram isoladas, conforme descrição de Hoskins et al. (1956), com

modificações: do meio de homogeneização (sacarose 0,25 M), do tampão de isolamento (EGTA e Tris-HCl) e da centrifugação (três etapas). Com o auxílio de uma tesoura realizou-se a separação do tórax das abelhas do resto do corpo, sendo descartado o restante e os tórax foram colocados em almofariz contendo o meio de isolamento (250 mM sacarose, 1 mM EGTA e 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2), mantido a 4°C, depois de macerado com um pistilo de porcelana foram filtrados em gaze dobrada por oito vezes.

Obteve-se a fração mitocondrial centrifugando a suspensão a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso com 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado novamente a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1 mL de meio contendo sacarose 250 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, mantido a 4°C e utilizado dentro de um período de três horas.

A atividade mitocondrial foi avaliada em meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl e 10 mM de HEPES-KOH (pH 7,4, 30°C), com adição de piruvato (4 mM) + malato (4 mM) para estimulação via NADH, ou succinato (4 mM) + rotenona (2,5 mM) para inibição do complexo I e avaliação específica do complexo II (Cain e Skilleter, 1987).

4.2.4 Avaliação da bioenergética mitocondrial “in vitro” e “in vivo”

A bioenergética mitocondrial foi avaliada em abelhas expostas a três fungicidas (bixafem, protioconazol e trifloxistrobina), seja de forma isolada ou em combinação (bix, pro, tri), por meio de experimentos “in vitro” e “in vivo”.

Para as análises “in vitro”, foi empregado um total de 1920 tórax de abelhas, oriundas de colônias com suplementação alimentar (CS). Esse número abrange as análises realizadas em dois conjuntos de substratos (malato/piruvato e succinato/rotenona) no estado III da respiração mitocondrial. Em cada ensaio foram utilizadas 960 tórax, divididos em quatro tratamentos (três princípios ativos isolados e uma combinação dos três p. a.), cada um testado em seis doses (0, 10, 25, 50, 100 e 150 µl) com três repetições. O fator manejo alimentar (com e sem suplementação) não foi considerado devido à indisponibilidade de abelhas provenientes de colônias sem suplementação para esse fim.

Para as análises “in vivo”, foram utilizadas 2700 abelhas adultas coletadas na entrada das colônias, sendo metade de cada grupo: colônias com suplementação alimentar (CS) e colônias sem suplementação alimentar (SS). Cada amostra foi composta por 50 abelhas, com três réplicas para cada tratamento. Os tratamentos consistiam na exposição de abelhas por contato no dorso do tórax com uma solução de contendo um dos três princípios ativos (bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina) ou a combinação dos três (bix, pro, tri) em duas doses (0,7 µg/ abelhas ou 2,1 µg/abelha) e um grupo controle. Para o grupo controle foi utilizado apenas metanol.

As abelhas foram anestesiadas em freezer e, em seguida, tratadas com 0,5 µl por contato, com a utilização de pipeta eletrônica, no dorso do tórax com um dos tratamentos. Após a aplicação, as abelhas foram realocadas em potes plásticos, respeitando sempre formar grupos oriundos da mesma colônia e alimentadas *ad libitum* com solução de sacarose a 50% (Suchail et al., 2009). Após uma hora, as abelhas mortas foram descartadas, e as abelhas vivas foram anestesiadas novamente em freezer para coleta do tórax, a preparação do homogenato e a determinação da proteína mitocondrial. Para garantir a reprodutibilidade das análises, foi necessário um mínimo de 25 abelhas vivas por repetição de cada tratamento.

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido utilizando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK), equipado com um eletrodo tipo Clark. As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em uma câmara termostaticada a 30°C, contendo um meio composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de K₂HPO₄, 0,5 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH pH 7,2, sob agitação. Os substratos utilizados foram piruvato (4 mM) com malato (4 mM) ou succinato (10 mM) associado rotenona (2,5 mM), um inibidor do complexo I. As taxas de consumo de oxigênio foram registradas pelo software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como nmol O₂.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.2.5 Quantificação da concentração de ATP por quimioluminescência em tórax de abelhas

Foram coletados 3.600 tórax de abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar (CS), avaliando-se a concentração de ATP pelo método de

quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Previamente a suspensão de mitocôndrias foi tratada nas condições de respiração com malato (4 mM) e piruvato (4 mM) e centrifugada 12.000 g por 10 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M gelado e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada amostra e elas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado TrisHCl 100 mM, pH 7,8, sendo as amostras centrifugadas a 12.000 g, por 120 minutos a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit. Assim como na avaliação de bioenergética “in vitro” o fator manejo alimentar (com e sem suplementação) não foi considerado devido à indisponibilidade de abelhas provenientes de colônias sem suplementação para esse fim.

4.2.6 Análises estatísticas

Para a avaliação das variáveis relacionadas à bioenergética mitocondrial, foi conduzido um experimento em delineamento inteiramente casualizado, estruturado em um esquema fatorial. O estudo “in vitro” e concentração de ATP incluíram quatro tratamentos com fungicidas (três princípios ativos individuais e uma combinação dos três) e seis doses (0, 10, 25, 50, 100 e 150 µM). Para as análises “in vivo” foi considerado o fator manejo nutricional das colônias com dois tratamentos (com e sem suplementação alimentar), quatro fungicidas (três princípios ativos isolados e uma combinação dos três p. a.) e três doses (controle, 0,7 µg/abelha e 2,1 µg/abelha). Como os dados obtidos não seguiram distribuição normal, foi aplicado um modelo misto linear generalizado com função de ligação logarítmica, apropriada para a distribuição dos dados. A comparação de cada fungicida nas concentrações (“in vitro”) e doses (“in vivo”) utilizadas foi realizada por meio do teste de Tukey, com um nível de significância de 5% (SAS Institute, 2020).

4.3 Resultados

4.3.1 Efeito do bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e sua combinação na respiração mitocondrial “in vitro”

O consumo de oxigênio das mitocôndrias do tórax das abelhas *Scaptotrigona postica* foi avaliado utilizando os substratos malato e piruvato em diferentes tratamentos com fungicidas (bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e a combinação bix, pro, tri) e doses crescentes (0, 10, 25, 50, 100 e 150 μM). O controle (dose 0) apresentou o maior consumo de oxigênio, utilizando malato e piruvato, com uma média de aproximada de 188 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, com diferença estatística em relação a todos os tratamentos com fungicidas (Figura 1).

No tratamento com Bixafem, o consumo de oxigênio variou em torno de 80 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ nas doses de 10 e 50 μM até cerca de 70 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ nas outras doses (25, 100 e 150 μM), indicando uma redução significativa em relação ao controle ($\pm 188 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$). Estatisticamente, as doses de 10 e 50 μM não diferiram entre si, assim como as doses de 25, 100 e 150 μM . Contudo, houve diferença significativa quando se comparam esses dois grupos de doses (10/50 vs. 25/100/150) (Figura 1).

Para o protioconazol, o consumo de oxigênio no controle (0 μM) foi de aproximadamente 188 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Nas doses de 10 e 25 μM o consumo ficou em torno de 68 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, houve redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, sem diferença estatística entre essas duas concentrações. Já nas doses de 50, 100 μM (59 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e 150 μM (55 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), a redução no consumo de oxigênio foi ainda maior, mantendo-se significativamente diferente do controle, porém sem diferenças estatísticas entre si. Portanto, em todas as concentrações de protioconazol avaliadas, a diminuição do consumo de oxigênio foi significativa quando comparada ao controle e ligeiramente mais acentuada do que a observada com bixafem (Figura 1).

A exposição à trifloxistrobina reduziu significativamente ($p < 0,05$) o consumo de oxigênio em comparação ao controle (0 μM), cujo valor foi de aproximadamente 188 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Entre 10 e 50 μM , os valores oscilaram em torno de 68 - 69 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, não apresentando diferença estatística entre

essas doses. Na concentração de 100 μM , entretanto, observou-se uma diminuição para cerca de 56 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ($p < 0,05$) em relação às outras doses, enquanto em 150 μM houve um aumento para aproximadamente 71 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Embora todas as doses testadas tenham apresentado redução significativa em relação ao controle, não se verificou um efeito dose-dependente, visto que a dose de 100 μM se destacou por produzir a maior redução de consumo, seguida de uma elevação nos valores a 150 μM (Figura 1).

A combinação dos três fungicidas (bix, pro, tri) apresentou maior consumo de oxigênio em relação aos fungicidas avaliados individualmente. O consumo variou de aproximadamente 80 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (10 μM) a 73 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (150 μM), sendo que a dose de 25 μM atingiu cerca de 90 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ sendo menor que o grupo controle e com diferença significativa ($p < 0,05$) tanto ao controle como entre as demais concentrações. As concentrações de 10, 50, 100 e 150 μM (80, 74, 76 e 73 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ respectivamente) não diferiram estatisticamente entre si, somente em relação ao grupo controle (Figura 1).

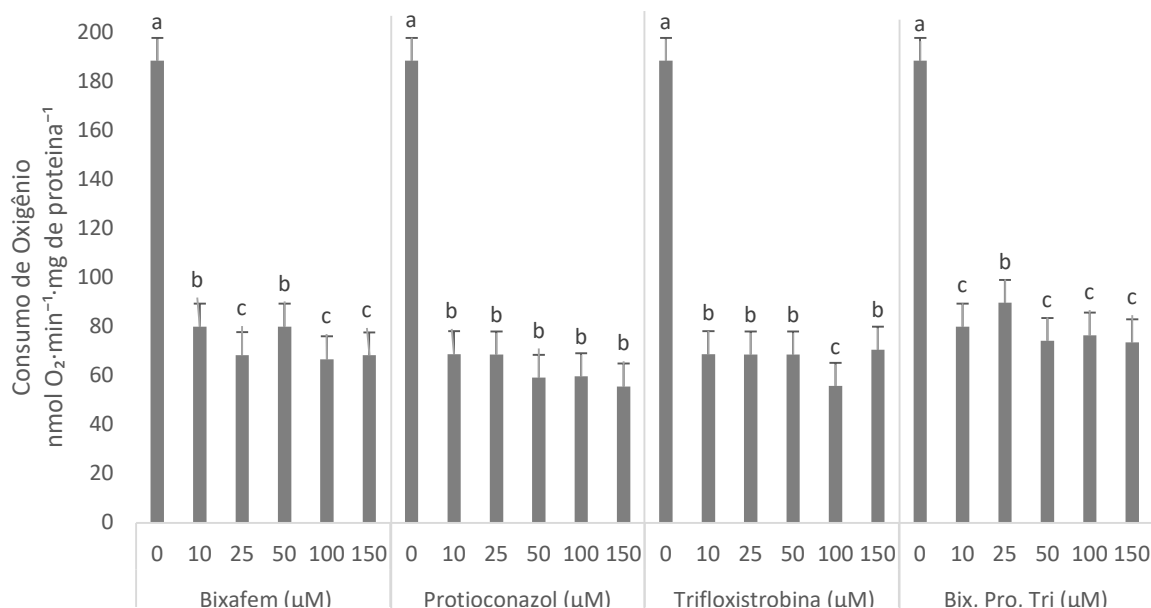


Figura 1. Consumo de oxigênio “in vitro” da respiração do “Estado III”, de mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas mandaguari, em diferentes tratamentos com fungicidas (Bixafem, Protiokonazol, Trifloxistrobina e a combinação Bix, Pro, Tri) e doses crescentes (10, 25, 50, 100 e 150 μM) e controles energizadas com Piruvato 4 mM + Malato 4 mM; abelhas de colônias que tinham alimentação com suplementação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

O consumo de oxigênio nas mitocôndrias das abelhas *Scaptotrigona postica* foi avaliado utilizando os substratos succinato e rotenona em diferentes tratamentos com fungicidas (bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e a combinação bix, pro, tri) e doses crescentes (0, 10, 25, 50, 100 e 150 μM). O controle (dose 0) resultou com maior consumo de oxigênio, com uma média de 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, com diferença estatística em relação a todos os tratamentos com fungicidas (Figura 2).

Os resultados mostram que, em comparação ao controle (0 μM , 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), todas as doses de bixafem reduziram significativamente o consumo de oxigênio. Ao agrupar as médias, observa-se que as doses de 10 μM (65 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), 25 μM (64 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e 100 μM (66 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) não diferiram estatisticamente entre si, formando um primeiro grupo. Já as doses de 50 μM (59 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e 150 μM (45 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) compuseram um segundo grupo, também sem diferença entre elas, mas diferente das três doses anteriores. Embora todas as concentrações de bixafem tenham resultado em reduções significativas em relação ao controle, essas reduções se distribuíram em dois grupos distintos: (1) 10, 25 e 100 μM , com valores próximos entre si; e (2) 50 e 150 μM , que apresentaram consumo de oxigênio ainda mais baixo (Figura 2).

O uso do fungicida protioconazol resultou em consumo reduzido de oxigênio em comparação ao controle (0 μM , 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$). A dose de 10 μM apresentou valor médio de 80 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, diferindo estatisticamente das demais doses testadas. As doses de 25, 50 e 100 μM apresentaram consumo médio de 59, 57 e 65 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, sem diferenças estatísticas entre elas. A dose de 150 μM , com consumo de aproximadamente 53 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, foi significativamente inferior ao controle, mas semelhante às doses intermediárias (Figura 2).

Em relação ao controle (0 μM , 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), todas as doses de trifloxistrobina (10, 25, 50, 100 e 150 μM) provocaram redução significativa no consumo de oxigênio. Observou-se que as doses de 10, 25 e 50 μM não diferiram estatisticamente entre si, com valores em torno de 64 a 69 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Já as concentrações de 100 μM (56 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e 150 μM (60 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) também não apresentaram diferença

significativa uma em relação à outra, mas mostraram valores de consumo de oxigênio menor que o grupo anterior. Dessa forma, embora todas as concentrações tenham apresentado redução em relação ao controle, elas se distribuíram em dois grupos distintos: (1) 10, 25 e 50 μM e (2) 100 e 150 μM , que diferiram estatisticamente entre si (Figura 2).

O tratamento com a combinação dos três fungicidas (bix, pro, tri) apresentaram redução significativa no consumo de oxigênio em todas as doses (10, 25, 50, 100 e 150 μM) em relação ao controle (dose 0 μM , 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$). As concentrações de 10 μM (87 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$) e 25 μM (79 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$) não diferiram estatisticamente entre si, mas ambas se distinguíram do controle e das demais doses. Já as concentrações de 50 μM (70 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$), 100 μM (75 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$) e 150 μM (76 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$) também não apresentaram diferenças entre si, mas formaram um grupo separado, mantendo valores de consumo de oxigênio ainda menores quando comparados às doses de 10 e 25 μM (Figura 2).

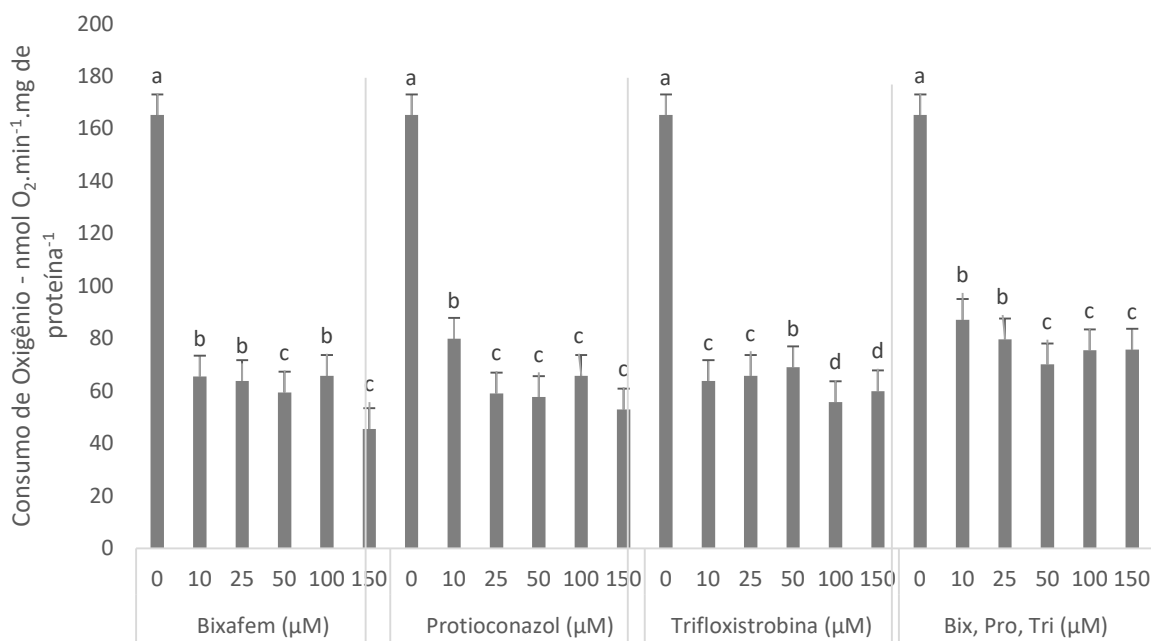


Figura 2. Consumo de oxigênio “in vitro” da respiração do “Estado III” em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas mandaguari, em diferentes tratamentos com fungicidas (Bixafem, Protioconazol, Trifloxistrobina e a combinação Bix, Pro, Tri) e doses crescentes (10, 25, 50, 100 e 150 μM) e controles energizadas com Succinato 4 mM (+ Rotenona 2,5 μM); abelhas de colônias que tinham alimentação com suplementação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

4.3.2 Efeito do bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e a combinação dos três p. a. na respiração mitocondrial “in vivo”

A respiração mitocondrial de mitrocondrias extraídas do tórax de abelhas mandaguari, energizadas com Piruvato 4 mM + Malato 4 mM, o consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína⁻¹) foi significativamente impactado pelas doses dos fungicidas (bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e a combinação dos três) e pela suplementação nutricional (Figura 3).

Ao analisar as abelhas provenientes de colônias sem suplementação alimentar, observou-se que o grupo controle teve o maior consumo de oxigênio, com valores próximos a $230 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, nível significativamente superior ($p < 0,05$) ao registrado em todos os tratamentos com fungicidas e doses avaliadas. Para o bixafem, a dose de $0,7 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ apresentou consumo de aproximadamente $185 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, e a dose de $2,1 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ resultou no consumo de cerca de $165 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, com diferenças estatísticas em relação ao controle e entre as doses. Para o protioconazol, os consumos foram de $185 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $0,7 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ e $160 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $2,1 \text{ } \mu\text{g/abelha}$, diferindo estatisticamente do controle e entre as doses. Para a trifloxistrobina, os valores foram de $150 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $0,7 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ e $180 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $2,1 \text{ } \mu\text{g/abelha}$, com diferenças significativas em relação ao controle e entre as doses. Na combinação dos três fungicidas, o consumo foi de $197 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $0,7 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ e $197 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ na dose de $2,1 \text{ } \mu\text{g/abelha}$, sem diferença entre as doses, porém ambos diferem significativamente do controle, com redução do consumo de oxigênio.

Ao analisar o grupo de abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar, verificou-se que o consumo de oxigênio no controle ficou em torno de $183 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle de colônias sem suplementação ($230 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹). Para o bixafem, os consumos das duas doses ($0,7$ e $2,1 \text{ } \mu\text{g/abelha}$) foram em torno de $165 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, sem diferença entre as doses, mas com diferenças estatísticas relação ao controle. Para o protioconazol, os valores foram de $171 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹

na dose de 0,7 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ que diferiu estatisticamente em relação ao controle e a dose maior de 2,1 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ que foi próxima a 188 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ não diferindo estatisticamente do controle. Para a trifloxistrobina, os consumos foram de 156 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 0,7 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, com diferença significativa em relação ao controle e a dose maior (2,1 $\mu\text{g}/\text{abelha}$), que resultou num consumo de 182 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, sem diferença estatística em relação ao controle. E na combinações dos três fungicidas, o consumo foi de 180 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 0,7 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ e 165 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 2,1 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, significativamente menores que o controle e com diferença estatística entre as doses.

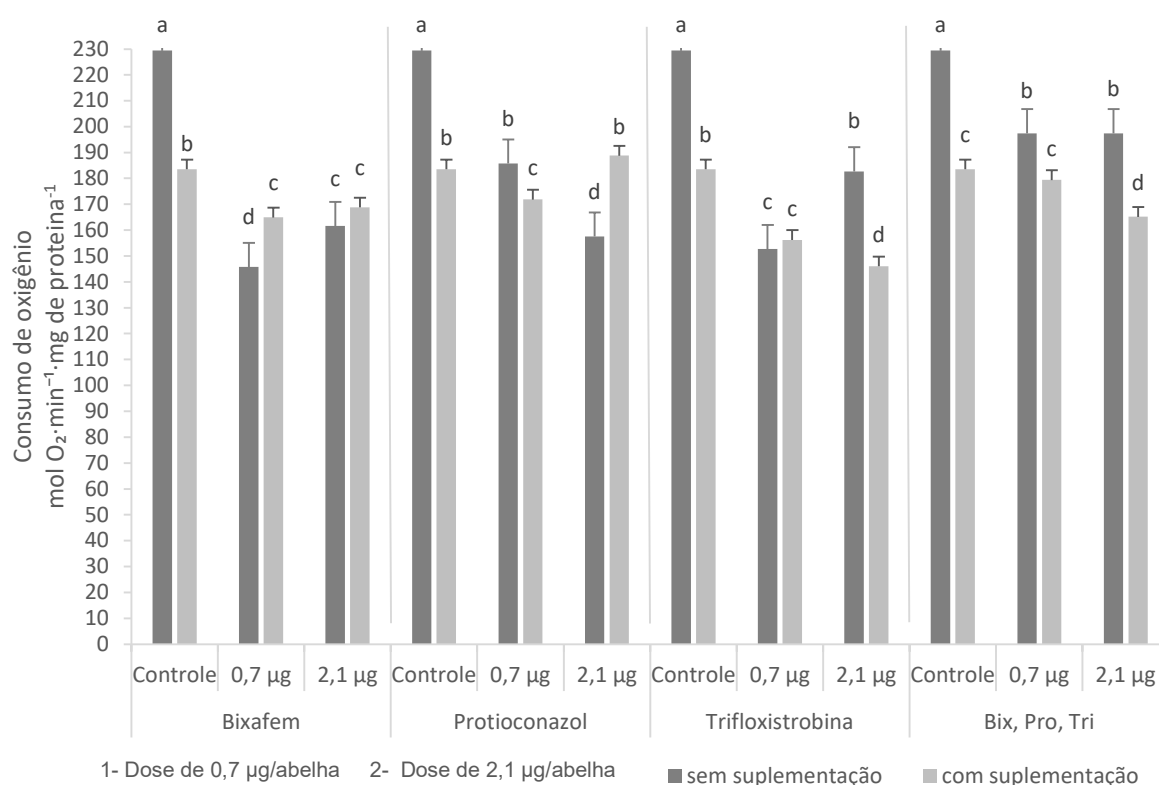


Figura 3. Consumo de oxigênio do estado III da respiração “*in vivo*” em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas mandaguari, extraídos após 1 hora de exposição por contato ao bixafem, protioconazol, trifloxistrobina isolados ou em combinação (Bix, Pro, Tri), nas concentrações de 0,7 e 2,1 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, e do grupo controle, energizadas com piruvato 4 mM + malato 4 mM. As abelhas eram provenientes de colônias sem e com suplementação alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação (bix, pro, tri) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram o consumo de oxigênio mitocondrial ($\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína⁻¹) no estado III da respiração mitocondrial, em mitocôndrias extraídas do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica* energizadas com succinato (4 mM) (+ rotenona 2,5 μM). O controle registrou o maior consumo de oxigênio em ambos os grupos com diferença no manejo alimentar, sendo significativamente superior nas abelhas sem suplementação nutricional ($\pm 277 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) em comparação às abelhas com suplementação ($\pm 204 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) ($p < 0,05$).

Para o bixafem, a dose de 0,7 $\mu\text{g/abelha}$ resultou no consumo de aproximadamente $165 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, e a dose de 2,1 $\mu\text{g/abelha}$ apresentou consumo de cerca de $185 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, com diferenças estatísticas em relação ao controle ($\pm 277 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e entre as doses. Para o protioconazol, os consumos foram em torno de $150 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 0,7 $\mu\text{g/abelha}$ e $170 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 2,1 $\mu\text{g/abelha}$, diferindo estatisticamente do controle e entre as doses. Em relação a trifloxistrobina, os valores aproximados foram de $165 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 0,7 $\mu\text{g/abelha}$ e $140 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 2,1 $\mu\text{g/abelha}$, com diferenças significativas em relação ao controle e entre as doses. Na combinação dos três fungicidas, o consumo foi de $174 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ nas duas doses de 0,7 e 2,1 $\mu\text{g/abelha}$, sem diferença entre as doses, porém ambos diferem significativamente do controle ($\pm 277 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), com redução do consumo de oxigênio.

No grupo de abelhas das colônias com suplementação alimentar podemos verificar que o consumo de oxigênio do controle para o bixafem ficou em torno de $204 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, apresentando diferença estatisticamente significativa entre as duas doses avaliadas ($\pm 150 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e sem diferença estatística entre as doses. Para o protioconazol, os valores foram de $165 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ na dose de 0,7 $\mu\text{g/abelha}$ que não diferiu estatisticamente em relação a dose maior de 2,1 $\mu\text{g/abelha}$ que foi próxima a $170 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, e ambas as doses diferiram estatisticamente do controle. Para a trifloxistrobina, os consumos foram de 135 e 143 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ nas doses de 0,7 e 2,1 $\mu\text{g/abelha}$, respectivamente, com diferença significativa

apenas em relação ao grupo controle. Para a combinações dos três fungicidas, o consumo foi de aproximadamente $146 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ em ambas as doses (0,7 e 2,1 $\mu\text{g/abelha}$), diferindo significativamente do grupo controle e sem diferença estatística entre as doses.

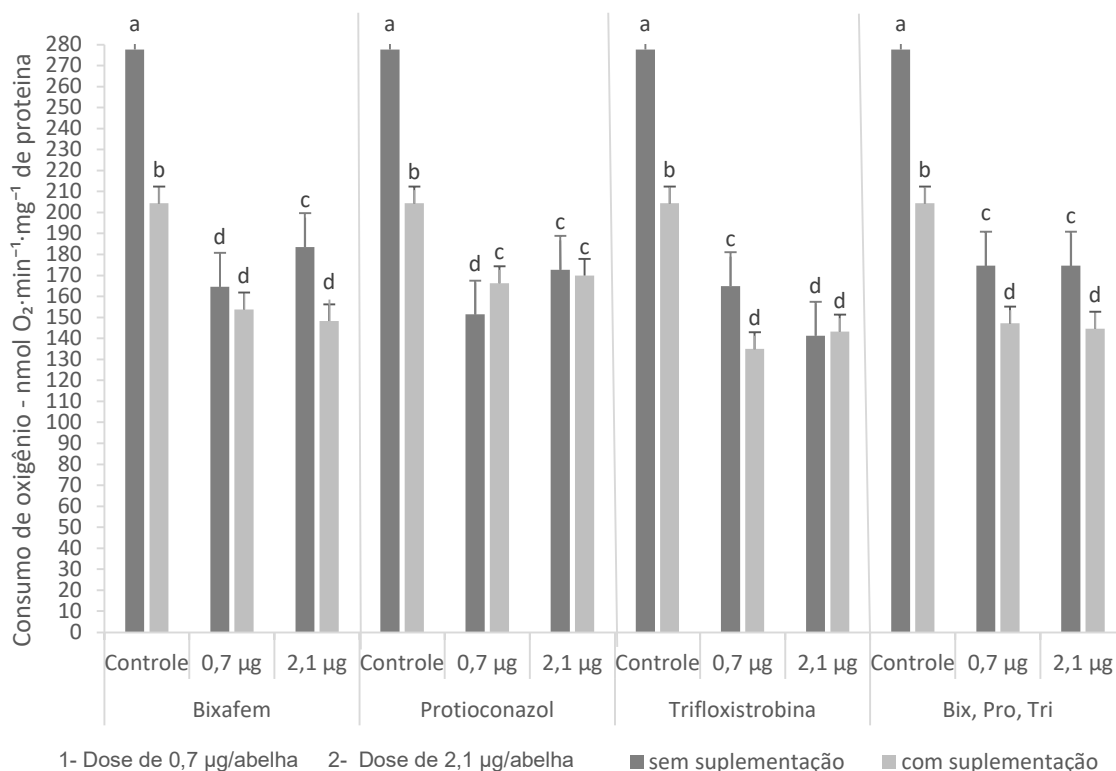


Figura 4. Consumo de oxigênio do estado III da respiração “*in vivo*” em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas mandaguari, extraídos após 1 hora de exposição por contato ao bixafem, protioconazol, trifloxistrobina isolados ou em combinação (Bix, Pro, Tri), nas concentrações de 0,7 e 2,1 $\mu\text{g/abelha}$, e do grupo controle, energizadas com succinato 4 mM (+ rotenona 2,5 μM). As abelhas eram provenientes de colônias sem e com suplementação alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a mistura (Bix, Pro, Tri) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

4.3.3 Efeito do bixafem, protioconazol, tribloxistrobina e sua combinação na concentração de ATP mitocondrial

A medida da concentração de ATP em mitocôndrias expostas às diferentes condições experimentais revelou variações significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 5). O controle apresentou o maior valor médio de ATP, com concentração positiva em torno de $37,5 \text{ nmol.mg de proteína}^{-1}$, sendo significativamente superior a todos os tratamentos. A exposição à rotenona demonstrou inibição do complexo I, o

que era esperado para podermos analisar o complexo II.

Para o bixafem, o grupo controle ($37,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) mostrou-se significativamente diferente de todas as concentrações avaliadas, sendo que a dose de $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($32 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹) também resultou em diferença estatística em relação as outras concentrações que ($25, 50, 100$ e $150 \text{ } \mu\text{M}$) que apresentaram valores aproximados de $25,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹, não diferindo estatisticamente entre essas doses mais altas (Figura 5).

Em relação ao fungicida protioconazol o controle ($37,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) apresentou valor superior com diferença estatística para todas as concentrações ($10, 25, 50, 100$ e 150 de $25 \text{ } \mu\text{M}$), sendo que somente a menor concentração ($10 \text{ } \mu\text{M}$ com consumo de $32 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) diferiu estatisticamente das outras concentrações que resultaram com um consumo médio de $26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. (Figura 5). A menor média foi observada em $150 \text{ } \mu\text{M}$ sendo que diferiu estatisticamente do controle, rotetona e todas as outras concentrações ($10, 25, 50$ e $10 \text{ } \mu\text{M}$).

Já a trifloxistrobina as médias foram as mais baixas, com os valores variando entre 20 e $22 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹ ($50, 100$ e $150 \text{ } \mu\text{M}$), sem diferença estatística entre elas. O grupo controle ($37,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹), a dose de $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($30 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) e $25 \text{ } \mu\text{M}$ ($26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹), foram diferentes significativamente entre si e em relação as concentrações mais altas ($50, 100$ e $150 \text{ } \mu\text{M}$). O tratamento com a combinação dos três p. a. (Bix, Pro, Tri) o grupo controle ($37,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) permaneceu significativamente mais alto do que todos as outras concentrações ($10, 25, 50, 100$ e $150 \text{ } \mu\text{M}$). A concentração de $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($32 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹) foi superior às concentrações de 25 ($24 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹), 50 ($26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹), 100 ($26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹) e $150 \text{ } \mu\text{M}$ ($25 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹).

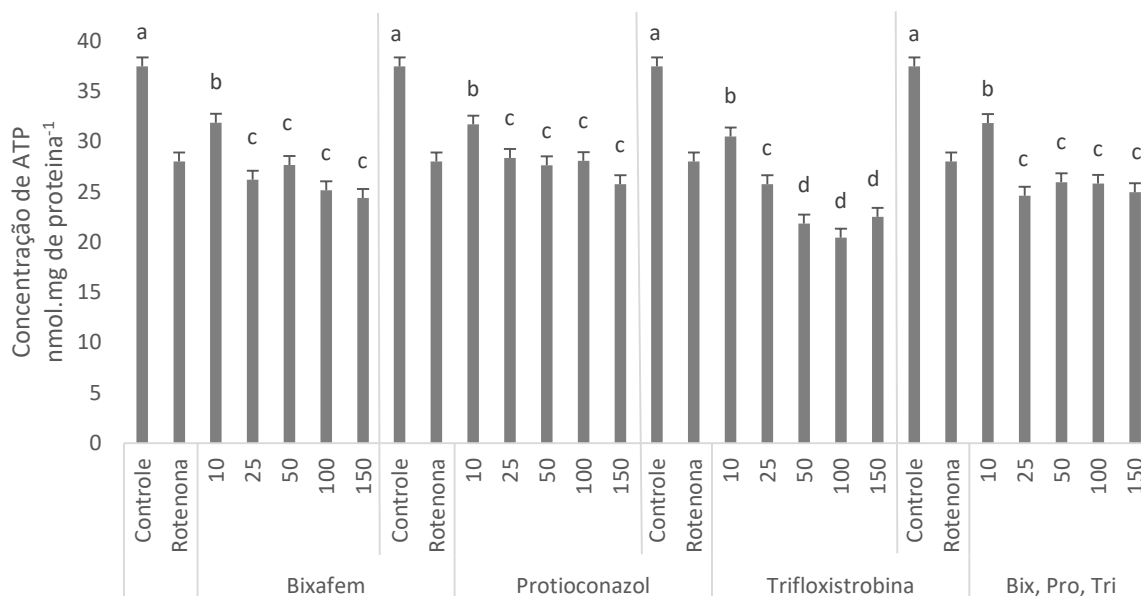


Figura 7. Concentração de ATP em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, e energizadas com Piruvato 4 mM + Malato 4 mM, pelo método de quimioluminescência, em diferentes tratamentos com fungicidas (Bixafem, Protioconazol, Trifloxistrobina e a combinação Bix, Pro, Tri) e doses crescentes (10, 25, 50, 100 e 150 µM), controle e rotenona; abelhas de colônias que tinham alimentação com suplementação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

4.4 Discussão

4.4.1 Efeito dos princípios ativos e sua combinação na respiração mitocondrial “in vitro”

Os resultados obtidos neste estudo revelam padrões complexos e diferenciados de inibição da respiração mitocondrial em *Scaptotrigona postica* quando exposta aos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, tanto isoladamente quanto em combinação. A análise detalhada dos dados permite observar que os efeitos variam significativamente em função do complexo mitocondrial avaliado, da dose aplicada e do estado nutricional das abelhas, oferecendo importantes insights sobre os mecanismos de ação desses compostos e suas implicações para a saúde dos polinizadores, corroborando estudos prévios que destacam a sensibilidade diferencial dos polinizadores a agroquímicos (Mao et al., 2017; Azpiazu et al., 2019).

Ao examinar especificamente o complexo I, avaliado através do sistema malato + piruvato, constatou-se que o protioconazol apresentou a maior eficácia inibitória, reduzindo o consumo de oxigênio em 60-70% em relação ao controle. Este resultado

está em perfeita concordância com trabalhos anteriores que demonstraram a capacidade dos fungicidas triazóis em interferir com a atividade da NADH desidrogenase, componente central do complexo I (Zhu et al., 2014; Huang et al., 2022). A ação potente e consistente deste fungicida em todas as concentrações testadas sugere uma interação específica e de alta afinidade com seus sítios-alvo na cadeia respiratória, levando a um comprometimento significativo da fosforilação oxidativa. É particularmente relevante notar que mesmo nas doses mais baixas, o protioconazol foi capaz de causar reduções substanciais na atividade respiratória (30-40% em 10 μ M), indicando seu potencial para causar impactos subletais mesmo em concentrações que não provocam mortalidade aguda, um padrão similar ao observado em *Apis mellifera* (Mao et al., 2017).

A avaliação do complexo II, realizada através do sistema succinato + rotenona, revelou um panorama distinto, porém igualmente preocupante. Todos os fungicidas testados mantiveram atividade inibitória significativa, embora com padrões variáveis. O protioconazol, embora menos eficaz neste sistema (51-68% de redução) do que no complexo I, ainda assim demonstrou considerável capacidade de interferência, reforçando a ideia de que seu mecanismo de ação pode envolver múltiplos componentes da cadeia respiratória. O bixafem apresentou um comportamento particularmente interessante no complexo II, com dois níveis distintos de inibição (60-73%) que não seguiram um padrão dose-dependente. Esta observação corrobora estudos recentes que sugerem mecanismos complexos de ação para as carboxamidas, possivelmente envolvendo tanto a interação direta com a succinato desidrogenase (Luo e Ning, 2022) quanto efeitos indiretos na organização supramolecular da cadeia respiratória (Johnson et al., 2021).

A trifloxistrobina merece atenção especial devido ao seu perfil inibitório atípico. Embora seja classicamente descrita como inibidora do complexo III (Campbell et al., 2016), nossos resultados demonstram efeitos significativos tanto no complexo I quanto no II. No complexo I, observou-se uma resposta não linear com pico de inibição em 100 μ M, enquanto no complexo II a inibição foi mais estável (~60%), mas com dois patamares distintos. Este comportamento sugere que, além de seu alvo principal no complexo III, a trifloxistrobina pode interferir indiretamente com outros componentes da cadeia respiratória, possivelmente através de alterações no pool de ubiquinona ou

no equilíbrio redox mitocondrial (Wang et al., 2017).

A análise da combinação dos três fungicidas revelou dados particularmente relevantes para a avaliação de risco ambiental. Observou-se que a mistura produziu efeitos aditivos, mas não sinérgicos, em ambos os complexos avaliados. Este achado é consistente com estudos recentes em abelhas melíferas que demonstraram ausência de sinergismo em misturas de fungicidas com modos de ação distintos (Tosi et al., 2017). Contudo, é crucial destacar que mesmo na ausência de potencialização, o comprometimento generalizado da fosforilação oxidativa representa uma séria ameaça para a homeostase energética das abelhas, especialmente quando consideramos a exposição crônica a múltiplos agroquímicos em condições de campo, conforme observado em estudos com diferentes espécies de polinizadores (Azpiazu et al., 2019).

Os aspectos ecológicos destes achados tornam-se ainda mais relevantes quando consideramos o contexto real de exposição das abelhas em ambientes agrícolas. A inibição persistente de ambos os complexos respiratórios principais pode comprometer gravemente a flexibilidade metabólica necessária para atividades fisiológicas críticas, como demonstrado em estudos que relacionaram a disfunção mitocondrial com redução na capacidade de voo e termorregulação em abelhas (Nicodemo et al., 2020). Além disso, a combinação de estressores nutricionais e químicos pode exacerbar esses efeitos, como sugerido pela menor resistência observada em abelhas com deficiências alimentares, um padrão consistente com observações em outros sistemas biológicos (Tosi et al., 2017; Azpiazu et al., 2019).

4.4.2. Efeito dos princípios ativos e sua combinação na respiração mitocondrial “in vivo”

Os resultados deste estudo demonstram efeitos diferenciados dos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina na respiração mitocondrial de *Scaptotrigona postica*, com variações importantes conforme o complexo respiratório avaliado e o estado nutricional das colônias. O protioconazol apresentou ação inibitória particularmente potente no complexo I, reduzindo o consumo de oxigênio em 28-30% nas abelhas sem suplementação alimentar e 6-17% nas suplementadas. Este padrão corrobora estudos que identificaram os triazóis como inibidores eficientes da NADH

desidrogenase em abelhas (Mao et al., 2017). A menor eficácia observada nas abelhas suplementadas sugere que o estado nutricional pode modular a sensibilidade a este grupo de fungicidas, possivelmente através de mecanismos de detoxificação mais eficientes (DeGrandi-Hoffman et al., 2015).

A trifloxistrobina, embora classicamente descrita como inibidora do complexo III, apresentou efeitos pronunciados no complexo II, com reduções de 40-49% nas abelhas sem suplementação e 29-34% nas suplementadas. Este achado expande o conhecimento atual sobre o espectro de ação das estrobilurinas em abelhas, sugerindo que podem atuar em múltiplos pontos da cadeia respiratória (Oliveira et al., 2021).

O bixafem mostrou um perfil de ação distinto, com efeitos intermediários em ambos os complexos e padrões de resposta não lineares. Esses padrões são característicos de compostos que atuam na cadeia respiratória mitocondrial, podendo envolver tanto a inibição direta da succinato desidrogenase (Stammler et al., 2015) quanto a indução de estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio (Li et al., 2003), mecanismos que explicam seus efeitos multifacetados. Esses mecanismos são particularmente relevantes para carboxamidas como o bixafem, que apresentam sítios de ação conservados entre fungos e animais (Lümmen, 2007).

A combinação dos três princípios ativos resultou em efeitos aditivos, consistente com estudos em *Apis mellifera* (Tosi et al., 2017), porém com diferenças que podem refletir variações interspecíficas (Nicodemo et al., 2020). Abelhas suplementadas apresentaram maior resistência aos efeitos inibitórios, relacionada possivelmente a maior disponibilidade de antioxidantes (Johnson et al., 2018) e melhor regulação mitocondrial (Alaux et al., 2019).

O manejo alimentar mostrou-se um fator crucial na modulação dos efeitos. Abelhas com suplementação alimentar apresentaram consumo basal de oxigênio 15-26% menor que as não suplementadas, porém maior resistência aos efeitos inibitórios dos fungicidas, especialmente nas doses mais baixas. Este fenômeno pode estar relacionado a: (1) maior disponibilidade de antioxidantes endógenos (Johnson et al., 2018); (2) melhor regulação da função mitocondrial, com aumento na expressão de genes da cadeia respiratória (Alaux et al., 2019); e (3) ativação mais eficiente de vias

de detoxificação (DeGrandi-Hoffman et al., 2015).

Contudo, mesmo nas abelhas suplementadas, as doses mais altas dos fungicidas ainda causaram reduções significativas no consumo de oxigênio, indicando que a nutrição, embora protetora, não confere imunidade completa aos efeitos dos agroquímicos. Estes resultados têm importantes repercussões ecológicas, pois a redução na capacidade respiratória pode afetar voo e forrageamento (Vaudo et al., 2018), termorregulação (Abou-Shaara et al., 2017) e imunidade (Alaux et al., 2017), destacando algumas necessidade, sendo elas uma revisão dos protocolos de avaliação de risco para abelhas nativas, além de uma maior atenção aos efeitos combinados de múltiplos agroquímicos, desenvolvimento de estratégias de suplementação nutricional como ferramenta de mitigação e estudos adicionais sobre as bases moleculares das diferenças interspecíficas na resposta a estressores químicos.

4.4.3 Efeito dos princípios ativos e sua combinação na concentração de ATP

Os resultados deste estudo demonstram os impactos significativos dos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina na produção de ATP em mitocôndrias isoladas do tórax de *Scaptotrigona postica*. O grupo controle apresentou níveis basais de ATP de $37,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, estabelecendo a capacidade máxima do sistema mitocondrial em condições ótimas. O bixafem exibiu um padrão de inibição bifásico, reduzindo os níveis de ATP para $32 \text{ nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ na dose de $10 \text{ } \mu\text{M}$ e estabilizando em torno de $25,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ nas concentrações mais elevadas ($25\text{-}150 \text{ } \mu\text{M}$). Este comportamento sugere múltiplos mecanismos de ação, conforme observado por Johnson et al. (2021) em estudos com carboxamidas em sistemas mitocondriais de invertebrados.

O protioconazol demonstrou ação inibitória potente, com reduções acentuadas já na menor concentração testada ($10 \text{ } \mu\text{M}$), padrão consistente com os achados de Biddinger et al. (2013) sobre triazóis. Na dose mais elevada ($150 \text{ } \mu\text{M}$), observou-se o efeito mais pronunciado, sugerindo interação com componentes do complexo I, conforme proposto por Zhu et al. (2014). A trifloxistrobina causou as reduções mais acentuadas ($20\text{-}22 \text{ nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), expandindo o conhecimento sobre estrobilurinas além de seu conhecido efeito no complexo III (Bartlett et al., 2002).

A combinação dos três princípios ativos resultou em efeitos aditivos, sem evidência de sinergismo, conforme descrito por Tosi et al. (2017). As reduções persistentes nos níveis de ATP ($24\text{-}32\text{ nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) sugerem impactos subletais relevantes em condições de campo, particularmente em exposições crônicas, como discutido por Nicodemo et al. (2014) e Fidelis et al. (2024).

As reduções observadas (até 47% do controle) têm implicações fisiológicas críticas, comprometendo funções energéticas intensivas como o voo, que demanda cerca de 97% da capacidade mitocondrial máxima (Suarez et al., 2005). Comparações com *Apis mellifera* (DeGrandi-Hoffman et al., 2015; Alaux et al., 2017) revelam diferenças marcantes na sensibilidade, destacando a necessidade de estudos específicos para abelhas nativas. Essas variações podem estar relacionadas a diferenças na organização dos complexos respiratórios ou eficiência de detoxificação (Mao et al., 2017).

Estes resultados reforçam a necessidade de revisão dos protocolos de risco para abelhas nativas, incorporando parâmetros bioenergéticos e considerando os efeitos combinados de agroquímicos, visando o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis para a conservação dos polinizadores.

4.5 Conclusão

Os fungicidas bixafem, prothioconazol e trifloxistrobina comprometeram significativamente a bioenergética mitocondrial de *Scaptotrigona postica*, reduzindo o consumo de oxigênio e a concentração de ATP, com efeitos mais pronunciados em doses elevadas ($50\text{ - }150\text{ }\mu\text{M}$) e em abelhas sem suplementação nutricional. Embora a suplementação alimentar tenha atenuado parcialmente esses impactos, não os neutralizou completamente, evidenciando a vulnerabilidade das colônias mesmo em condições nutricionais favoráveis. A combinação dos fungicidas resultou em efeitos aditivos, reforçando a necessidade de avaliar interações entre agroquímicos em condições realistas de exposição. Esses resultados destacam a importância de revisar estratégias de manejo agrícola e apícola, integrando a redução do uso de agrotóxicos com o fortalecimento nutricional das colônias, visando à conservação dos polinizadores e dos serviços ecossistêmicos que prestam.

Referências

- Abou-Shaara HF, Al-Ghamdi AA, Mohamed AA (2013) Honey bee colonies performance enhance by newly modified beehives. **Journal of Apicultural Research** 52(2):1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.03>
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters** 6:562-565. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Alves TRR, Nicodemo D, De Jong D, Nogueira Couto RH, Mingatto FE (2024) Pollen contaminated with a triple-action fungicide induced oxidative stress and reduced longevity though with less impact on lifespan in honey bees from well fed colonies. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 112:104587. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104587>
- Azpiazu C, Bosch J, Viñuela E, Medrzycki P, Teper D, Sgolastra F (2019) Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. **Scientific Reports** 9(1):13770. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50255-4>
- Barascou L, Sene D, Le Conte Y, Alaux C, Pioz M (2021) Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. **Royal Society Open Science** 8(9):210818. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsos.210818>
- Bartlett DW et al. (2002) The strobilurin fungicides. **Pest Management Science** 58(7):649-662. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Bayer SA (2019) **Fox Xpro: Fungicida**. Agro Bayer. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protecaodecultivos/fox-xpro>>.
- Biddinger DJ et al. (2013) Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). **PLOS ONE** 8(9):e72587. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072587>
- Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). **Annual Review of Biochemistry** 75:69-92. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539>
- Campbell JB, Nath R, Gadau J, Fox T, DeGrandi-Hoffman G, Harrison JF (2016) The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. **Journal of Insect Physiology** 86:11-16. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.003>
- Chance B, Williams GR (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry** 217(1):409-427. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)57190-3/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)57190-3/pdf)

Degradandi-Hoffman G, Chen Y, Watkins Dejong E, Chambers ML, Hidalgo G (2015) Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology** 108(6):2518-2528. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>

Ferraz YMM (2024) **Efeito da nutrição e da própolis verde sobre aspectos biológicos em abelhas melíferas expostas ao fungicida Fox Xpro**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11449/256929>

Freitas TAL, Nicodemo D, Malheiros EB, Torres MB, Nogueira Couto RH (2024a) Contact exposure of honey bees and social stingless bees to fungicide sprayed on cotton and soybean in a controlled field simulation system. **Journal of Applied Entomology** 148:861-869. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jen.13293>

Freitas TAL, Nicodemo D, Malheiros EB, Torres MB, Nogueira Couto RH (2024b) Food supplementation does not prevent oxidative stress in forager honey bees exposed to the fungicides Bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin. **Journal of Apicultural Research** 1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2406101>

Huang T, Jiang H, Zhao Y, He J, Cheng H, Martyniuk CJ (2022) A comprehensive review of 1, 2, 4-triazole fungicide toxicity in zebrafish (*Danio rerio*): A mitochondrial and metabolic perspective. **Science of The Total Environment** 809:151177. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151177>

Johnson RM (2015) Honey bee toxicology. **Annual Review of Entomology** 60:415-434. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>

Kato AY, Freitas TAL, Gomes CRA, Nicodemo D, Mingatto FE, Nogueira Couto RH (2024) Bixafen, prothioconazole, and trifloxystrobin alone or in combination have a greater effect on health related gene expression in honey bees from nutritionally deprived than from protein supplemented colonies. **Insects** 15(7):523. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects15070523>

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols** 3(6):965-976. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2008) **Principles of Biochemistry**. 5ª ed. New York: W.H. Freeman, 1152 p.

Lima YS (2023) **O inseticida fipronil altera a expressão gênica em abelhas melíferas africanizadas**. 180 f. Tese (Doutorado) – Unesp, Botucatu. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11449/251222>

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. **Journal of Biological Chemistry** 278(10):8516-8525. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>

Lümmem P (2007) Mitochondrial electron transport complexes as biochemical target sites for insecticides and acaricides. In: **Insecticides Design Using Advanced Technologies** p. 197-215. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-540-46907-0_8

Luo B, Ning Y (2022) Comprehensive overview of carboxamide derivatives as succinate dehydrogenase inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 70(4):957-975. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05589>

Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR (2017) Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (**Apis mellifera**). **Proceedings of the National Academy of Sciences** 114(10):2538-2543. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>

Menezes C, Neto AJS, Contrera FAL, Venturieri GC (2013) The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology** p. 153-171. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10

Naug D (2009) Structure and resilience of the social network in an insect colony as a function of colony size. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 63:1023-1028. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0721-x>

Nicholls DG, Ferguson SJ (2013) **Bioenergetics 4**. Academic Press, 432 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64902-9>

Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC, Guelfi M, Balieira KVB, De Jong D, Mingatto FE (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry** 33(9):2070-2075. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.2655>

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, Nogueira Couto RH, Malheiros EB (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry** 39:1267-1272. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.4719>

Pacífico-da-Silva I, Melo MM, Soto-Blanco B (2016) Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 10(1):142-157. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5391733>

Paludo CR et al. (2018) Fungus-produced sterols mediate developmental mutualism between a social bee and its symbiotic fungus. **Nature Communications** 9(1):3434. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05980-1>

ROSSI EM et al. (2020) **Abelhas & Agrotóxicos: Compilação sobre as evidências científicas dos impactos dos agrotóxicos sobre as abelhas**. Petição perante a Relatoria DESCA da Comissão Interamericana de Direitos Humanos. Disponível em: <<https://navdanyainternational.org/wp-content/uploads/2020/11/abelhas2020.pdf>>.

Acesso em: 10 jun. 2024. Disponível em: <https://navdanyainternational.org/wp-content/uploads/2020/11/abelhas2020.pdf>

Stammli G, Wolf A, Glaettli A, Klappach K (2015) Respiration Inhibitors: Complex II. In: **Fungicide Resistance in Plant Pathogens** p. 93-106. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_8

Suarez RK, Darveau CA, Welch KC (2005) Energy metabolism in orchid bee flight muscles: carbohydrate fuels all. **Journal of Experimental Biology** 208(Pt 18):3573-3579. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.01775>

Tosi S, Nieh JC, Sgolastra F, Cabbri R, Medrzycki P (2017) Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B** 284(1869):20171711. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1711>

Vaudo AD, Patch HM, Mortensen DA, Tóth AL, Grozinger CM (2016) Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 113(28):E4035-E4042. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606101113>

Wang M, Wang L, Han L, Zhang X, Feng J (2017) The effect of carbonyl on mitochondrial respiratory chain complexes in *Gaeumannomyces graminis*. **Journal of Applied Microbiology** 123(5):1100-1110. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13575>

Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL (2014) Assessment of the toxicity of multiple pesticides on honey bees: The potential for interactive effects. **Pest Management Science** 70(2):221-231. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3560>

CAPÍTULO 5 – Efeito da suplementação nutricional sobre o sistema antioxidante em abelhas *Scaptotrigona postica* expostas à fungicidas

RESUMO – O sistema antioxidante desempenha um papel essencial na manutenção do equilíbrio celular em organismos vivos, mas pode ser comprometido por fatores externos, como agrotóxicos e condições nutricionais inadequadas. Este estudo avaliou a eficácia da suplementação alimentar na mitigação do estresse oxidativo induzido por fungicidas em abelhas *Scaptotrigona postica*. Doze colônias foram divididas em dois grupos: cinco receberam suplementação alimentar com uma dieta fermentada enriquecida à base de proteína isolada de soja, levedo de cerveja, pão de abelha, açúcar e leite de soja durante 13 semanas, enquanto as outras seis não foram suplementadas. Após esse período, as abelhas foram expostas por contato com duas doses (0,7 e 2,1 µg) dos fungicidas bixafem, prothioconazol, trifloxistrobina isolados ou à combinação dos três princípios ativos. Verificamos que a suplementação alimentar atenuou parcialmente os efeitos dos fungicidas, promovendo a estabilidade dos níveis de glutathione reduzida (GSH), de malondialdeído (MDA) e, modulando a atividade da catalase (CAT). Embora a atividade da glutathione peroxidase (GPx) tenha permanecido inalterada, a exposição aos fungicidas – especialmente em doses mais elevadas ou com a combinação dos três compostos – ocasionou alterações significativas em outros marcadores, como os níveis de NAD(P)H e a oxidação dos grupos tióis de proteínas. Esses achados indicam que, embora a suplementação fortaleça a resistência antioxidante das abelhas, ela não confere proteção completa frente ao estresse oxidativo induzido pelos fungicidas. A análise integrada dos marcadores bioquímicos evidencia, assim, a complexidade das respostas antioxidantes e os limites dessa estratégia diante da ação dos xenobióticos.

Palavras-chave: Abelha mandaguari, catalase, glutathione, nutrição, restrição alimentar

CHAPTER 5 – Effect of nutritional supplementation on the antioxidant system in *Scaptotrigona postica* bees exposed to fungicides

ABSTRACT - The antioxidant system plays an essential role in maintaining cellular balance in living organisms, but it can be compromised by external factors such as pesticides and inadequate nutritional conditions. This study evaluated the effectiveness of food supplementation in mitigating fungicide-induced oxidative stress in *Scaptotrigona postica* bees. Twelve colonies were divided into two groups: five received food supplementation with an enriched fermented diet based on isolated soy protein, brewer's yeast, bee bread, sugar and soy milk for 13 weeks, while the other six were not supplemented. After this period, the bees were exposed by contact with two doses (0.7 and 2.1 μg) of the fungicides bixafem, prothioconazole, trifloxystrobin alone or a combination of the three active ingredients. We found that dietary supplementation partially attenuated the effects of the fungicides, promoting stable levels of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and modulating catalase (CAT) activity. Although the activity of glutathione peroxidase (GPx) remained unchanged, exposure to fungicides - especially at higher doses or with the combination of the three compounds - caused significant changes in other markers, such as NAD(P)H levels and the oxidation of protein thiol groups. These findings indicate that although supplementation strengthens bees' antioxidant resistance, it does not provide complete protection against fungicide-induced oxidative stress. The integrated analysis of biochemical markers thus highlights the complexity of antioxidant responses and the limits of this strategy in the face of the action of xenobiotics.

Keywords: Mandaguari bee, catalase, ROS, glutathione, nutrition, food restriction

5.1 Introdução

A crescente utilização de fungicidas na agricultura moderna, impulsionada pela necessidade de controle de pragas e doenças, tem gerado preocupações quanto aos impactos sobre organismos não-alvo, especialmente os polinizadores. As abelhas sem ferrão, como a *Scaptotrigona postica*, desempenham um papel essencial na polinização, contribuindo para a reprodução de culturas agrícolas e para a manutenção da diversidade vegetal nesses ambientes (Klein et al., 2007; Imperatriz-Fonseca et al., 2012). Contudo, o uso intensivo de agrotóxicos, como os fungicidas, representa uma ameaça significativa para a saúde e a sobrevivência desses polinizadores, podendo desencadear efeitos deletérios, a partir do estresse oxidativo (Alves et al., 2024; Kato et al., 2024; Freitas et al., 2024b; Ferraz, 2024).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade do organismo de neutralizá-las, resultando em danos ao DNA, proteínas e lipídios, além de comprometer funções fisiológicas essenciais, como o sistema imunológico e a reprodução (Sies, 1993; Balieira et al., 2018). Esses impactos podem reduzir a longevidade, a capacidade de aprendizado e memória, e a resistência a patógenos e agrotóxicos, afetando diretamente a sobrevivência das colônias (Morimoto et al., 2011; Klein et al., 2017). Além disso, fatores ambientais, como mudanças climáticas e a redução da disponibilidade de recursos alimentares, agravam a vulnerabilidade das abelhas ao estresse oxidativo (Schmehl et al., 2014; Sanchez-Bayo & Wyckhuys, 2019; Soroye et al., 2020).

O sistema antioxidante das abelhas, composto por enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, desempenha um papel crucial na proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, sua eficácia depende da nutrição adequada, frequentemente prejudicada em ambientes agrícolas dominados por monoculturas e pelo uso de agrotóxicos (Vaudo et al., 2015; Wright et al., 2018). Nesse contexto, a suplementação alimentar tem sido sugerida como uma estratégia para mitigar os danos causados por estressores ambientais. Estudos indicam que a suplementação pode fortalecer as defesas antioxidantes e melhorar a resistência das abelhas, embora suas limitações em cenários de exposição prolongada a fungicidas ainda precisem ser mais bem compreendidas (Mao et al., 2017; Balieira et al., 2018).

A exposição a fungicidas modernos, como bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, que são aplicados misturados nas lavouras, representa um desafio adicional. Esses compostos, amplamente utilizados em culturas como soja, milho e algodão, têm sido associados a danos no sistema antioxidante das abelhas, resultando em maior estresse oxidativo e em consequências prejudiciais para esses insetos (Carneiro et al., 2020; Batista et al., 2020). Além disso, a interação entre fungicidas, doenças e outros estressores ambientais amplifica os impactos negativos, comprometendo a saúde e a sobrevivência das colônias (Schmehl et al., 2014; Schulz et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi investigar as limitações da suplementação alimentar na prevenção do estresse oxidativo ocasionado pela exposição por contato aos fungicidas bixafem, protioconazol e trifloxistrobina, tanto isolados quanto em combinação, em abelhas *Scaptotrigona postica*.

5.2 Material e Metodos

5.2.1 Local do experimento e manejo alimentar das colônias de abelhas

O experimento foi conduzido no Meliponário Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Paulista (Unesp), localizado na cidade de Dracena, Estado de São Paulo, Brasil (21°45'8" S, 51°55'63" O, 421 m de altitude). O manejo alimentar iniciou dia 04 de novembro de 2023 até 10 de fevereiro de 2024, totalizando 13 semanas.

Foram utilizadas 12 colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*, mantidas em colmeias padrão INPA (20 x 20 x 50 cm) e divididas em dois grupos experimentais. O primeiro grupo, composto por seis colônias, recebeu suplementação proteica elaborada com 15 g de levedo de cerveja, 20 g de proteína isolada de soja, 20 g de açúcar, 40 ml de leite de soja e 5 g de pão de abelha coletado de colônias de abelhas melíferas do apiário da Unesp de Dracena. Os ingredientes foram misturados e acondicionados em potes plásticos de 250 ml com tampa perfurada (para saída de gases), fermentando em câmara B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) sob condições controladas (28°C e 70% de umidade relativa) por sete dias. A quantidade de 20 g semanais ofertada a cada colônia do grupo suplementado (CS) foi determinada por meio de observações preliminares do consumo, garantindo que não houvesse sobras

de alimento que pudessem atrair inimigos naturais

O segundo grupo experimental, também composto por seis colônias (SS), não recebeu suplementação alimentar. Todas as colônias, independentemente do grupo, tiveram livre acesso ao ambiente externo para coleta de recursos naturais, como néctar, pólen, água e matérias-primas para a produção de própolis.

5.2.2 Exposição tópica aos fungicidas e condições experimentais

Durante quatro dias consecutivos, após o período de manejo nutricional das colônias, as abelhas campeiras de ambos os grupos (com e sem suplementação alimentar) foram coletadas utilizando potes plásticos perfurados posicionados na entrada das colmeias, garantindo a obtenção de abelhas adultas. Em cada um dos quatro dias, cerca de 70 abelhas foram coletadas das seis colônias de cada um dos dois grupos de manejo alimentar. As abelhas foram colocadas em recipientes plásticos transparentes com um volume de 0,25 L e tampas com orifícios que permitem a troca de gases. No laboratório, os recipientes foram colocados em um freezer (-18 °C) por alguns minutos para anestesiá-las.

Os princípios ativos bixafem (Bix), protioconazol (Pro) e trifloxistrobina (Tri), adquiridos da Sigma-Aldrich, foram utilizados isolados ou em combinação dos três (Bix, Pro, Tri). As soluções dos fungicidas foram preparadas utilizando acetona como solvente, nas dosagens de 0,7 µg (dose 1) e 2,1 µg (dose 2) em um volume final de 0,5 µL, e todos os reagentes utilizados eram de grau analítico com alta pureza. As doses foram determinadas com base em um estudo que teve como objetivo estimar as doses que podem afetar as abelhas mandaguari (*Scaptotrigona postica*), quando um fungicida comercial contendo os três p. a. é aplicado, de acordo com as recomendações agronômicas (Bayer, 2019; Freitas et al., 2024b). Para cada um dos dois grupos controle (um com abelhas de colônias sem suplementação e outro com abelhas de colônias com suplementação), apenas acetona sem nenhum princípio ativo foi aplicada no torax das abelhas. Sob anestesia, as abelhas foram tratadas topicamente uma vez com uma das duas doses (0,7 e 2,1 µg) de cada p. a. ou com todos os três fungicidas juntos com as mesmas doses.

Após a aplicação, os indivíduos foram acondicionados em potes plásticos, garantindo a separação por colônia de origem para evitar conflitos intraespecíficos.

Posteriormente, os potes foram mantidos em uma estufa sob condições controladas de temperatura (33 °C) e umidade relativa do ar (70%) por um período de 1 hora. Durante esse período, as abelhas receberam alimentação *ad libitum* com uma solução de xarope de açúcar (2:1) contendo duas partes de sacarose de cana-de-açúcar e uma parte de água, por volume. Passado uma hora de exposição por contato aos princípios ativos, 50 abelhas vivas, que receberam o mesmo tratamento foram escolhidas aleatoriamente de colônias com e sem suplementação para obtenção do homogenato. Em resumo, foram utilizadas 1350 abelhas de colônias em cada grupo de (50 abelhas x 3 réplicas x 4 fungicidas x 2 doses + 50 abelhas x 3 réplicas do grupo de controle).

5.2.3 Obtenção do homogenato do tórax das abelhas mandaguari

Após uma hora da exposição aos fungicidas, as abelhas vivas que receberam o mesmo tratamento foram novamente anestesiadas, sendo colocadas em um ambiente refrigerado a 4 °C por cerca de dois minutos. Em seguida, utilizando uma tesoura de precisão, foi realizado o corte cuidadoso para separar o tórax do restante do corpo, descartando as pernas e asas. Os tórax foram transferidos para um almofariz contendo 10 mL de uma solução de isolamento composta por sacarose (250 mM), EGTA (1 mM) e HEPES-KOH (10 mM), com pH ajustado para 7,2. Essa solução foi mantida refrigerada a 4 °C para preservar a integridade das amostras durante o processamento. Os tórax foram então macerados manualmente com um pistilo de porcelana até formar uma suspensão homogênea.

O material macerado foi filtrado oito vezes utilizando gaze dobrada, seguindo o método descrito por Hoskins et al. (1956), com modificações: do meio de homogeneização (sacarose 0,25 M), do tampão de isolamento (EGTA e Tris-HCl) e da centrifugação (três etapas). Com o auxílio de uma tesoura realizou-se a separação do tórax das abelhas do resto do corpo, sendo descartado o restante e os tórax foram colocados em almofariz contendo o meio de isolamento (250 mM sacarose, 1 mM EGTA e 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2), mantido a 4°C, depois de macerado com um pistilo de porcelana foram filtrados em gaze dobrada por oito vezes. Esse processo permitiu a obtenção de um filtrado limpo e adequado para as análises posteriores, removendo partículas sólidas e outros resíduos.

5.2.4 Concentração de oxidantes enzimáticos

Todas as análises foram realizadas em quatro repetições independentes para garantir a confiabilidade dos resultados.

5.2.4.1 Determinação da atividade de glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi avaliada por meio do método direto descrito por Flohé e Günzler (1984), que utiliza a oxidação da glutathione reduzida (GSH) catalisada pela GPx, resultando na consequente oxidação do NADPH. A reação foi realizada em um sistema contendo 1,5 mL de solução reacional composta por 1,0 mM de GSH, 0,2 mM de NADPH, 0,25 mM de H_2O_2 , 0,5 mM de EDTA e 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,6), além de homogenato do tórax ajustado para 1 mg de proteína/mL. A reação foi conduzida a 30 °C, e a atividade enzimática foi monitorada continuamente utilizando um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800. A absorbância foi medida a 340 nm, registrando-se a diminuição correspondente à oxidação do NADPH. A atividade da GPx foi expressa em termos de NADPH oxidado, considerando-se uma unidade de atividade como a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto. A atividade específica foi calculada e expressa em unidades por mg de proteína por minuto (U/mg de proteína/min).

5.2.4.2 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase foi realizada com o homogenato de tórax de abelhas (1 mg de proteína/mL) em 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7). A reação foi iniciada pela adição de 200 μL de H_2O_2 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 μmol de H_2O_2 por minuto, a 25°C e pH 7. A absorbância foi lida em espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 a 230 nm. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína por minuto (U/mg de proteína/min) (AEBI, 1974).

5.2.5 Concentração de oxidantes não enzimáticos

5.2.5.1 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH)

A concentração de GSH no homogeneizado de tórax foi determinada conforme o método descrito por Hissin e Hilf (1976), utilizando tubos do tipo Eppendorf de 2 mL.

Para a análise, 1 mg de proteína do homogeneizado foi diluído em um meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl e 10 mM de HEPES-KOH (pH 7,4), completando um volume final de 1 mL. Após homogeneização leve, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 13%, seguido de agitação vigorosa. A mistura foi centrifugada a 9000 g por 3 minutos, e o sobrenadante resultante foi transferido para análise. Para a reação, 1800 µL de tampão contendo 0,1 M de NaH_2PO_4 (pH 8,0) e 5 mM de EDTA foram adicionados a tubos de ensaio de 5 mL, juntamente com 100 µL do sobrenadante e 100 µL de o-ftalaldeído (OPT) a 1 mg/mL. Os tubos foram agitados e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura da fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm.

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

Amostras de homogeneizado de tórax, ajustadas para uma concentração de 1 mg de proteína/mL, foram adicionadas a um meio de reação composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl e 10 mM de HEPES-KOH (pH 7,4), totalizando um volume final de 2 mL. Após a preparação, as amostras foram submetidas à leitura em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, com os comprimentos de onda ajustados para 366 nm (excitação) e 450 nm (emissão). Os resultados foram registrados como Unidades Relativas de Fluorescência (URF), permitindo a quantificação dos níveis de fluorescência emitidos pelo sistema de reação.

5.2.6 Danos oxidativos

5.2.6.1 Avaliação da lipoperoxidação

A peroxidação dos lipídeos de membrana (lipoperoxidação) foi avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Para a análise, 5 mg de proteína do homogeneizado foram transferidos para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, 1,5 mL de ácido acético a 20% (pH ajustado para 3,5) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% (solução aquosa). O volume final foi ajustado para 4 mL com água ultrapura (Milli-Q). Os tubos foram incubados em banho-maria a 95 °C por 60 minutos para promover a formação do complexo MDA-TBA. Após

o período de incubação, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água Milli-Q, e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de *n*-butanol. Os tubos foram agitados suavemente para facilitar a extração e centrifugados a 2000 g por 10 minutos. A fase orgânica (superior) foi cuidadosamente coletada, e a absorbância foi medida a 535 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração de lipoperóxidos foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, sendo os resultados expressos em termos de concentração do complexo MDA-TBA. Este procedimento assegura a quantificação precisa da lipoperoxidação como um marcador de dano oxidativo.

5.2.6.2 Oxidação de grupos tióis de proteínas

A concentração de grupos tióis (-SH) de proteínas foi determinada utilizando o reagente de Ellman (DTNB), conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968), com modificações. Para a análise, uma alíquota do homogeneizado contendo 5 mg de proteína foi tratada com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% em solução contendo 5 mM de EDTA. A mistura foi submetida a centrifugação a 2500 g por 5 minutos, e o precipitado proteico obtido foi lavado duas vezes com a mesma solução de TCA-EDTA para a remoção de contaminantes. As proteínas precipitadas foram redissolvidas em 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), contendo 5 mM de EDTA e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), garantindo a solubilização completa das proteínas. Alíquotas dessa solução foram tratadas com DTNB (concentração final de 0,1 mM) preparado em 2 mL de tampão Tris-EDTA (pH 8,6). As amostras foram incubadas no escuro para evitar interferências na reação. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 a 412 nm. Para controle, os valores foram ajustados subtraindo-se um branco obtido pelo tratamento das amostras com 5 mM de N-etilmaleimida antes da reação com DTNB. A concentração de grupos tióis foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e os resultados foram expressos em termos de concentração de grupos tióis por miligrama de proteína.

5.2.7 Análises estatísticas

Para a análise dos dados de cada uma das variáveis do metabolismo oxidativo foi empregado um planejamento fatorial de dois fatores. O estudo incluiu dois manejos nutricionais das colônias (com e sem suplementação alimentar), quatro tratamentos

com fungicidas (três ingredientes ativos individuais e uma combinação dos três) e três doses (controle, 0,7 µg/abelha e 2,1 µg/abelha). Os dados obtidos não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado um modelo misto linear generalizado com função de ligação logarítmica, apropriada para a distribuição dos dados. A comparação entre os tratamentos foi realizada por meio do teste de Tukey, com um nível de significância de 5% (SAS Institute, 2020).

5.3 Resultados

5.3.1 Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) apresentou os seguintes valores médios (mU/mg): no grupo sem suplementação, o controle registrado 39,5 mU/mg, enquanto os tratamentos com fungicidas, avaliados nas doses de 0,7 µg e 2,1 µg, tiveram médias de aproximadamente 42,3 mU/mg e 41,5 mU/mg, respectivamente. No grupo com suplementação, o controle apresentou 37 mU/mg e os tratamentos, para ambas as doses (0,7 µg e 2,1 µg), evidenciaram uma média de 36 mU/mg. Em todos os casos, as diferenças entre os tratamentos e os respectivos controles não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 1).

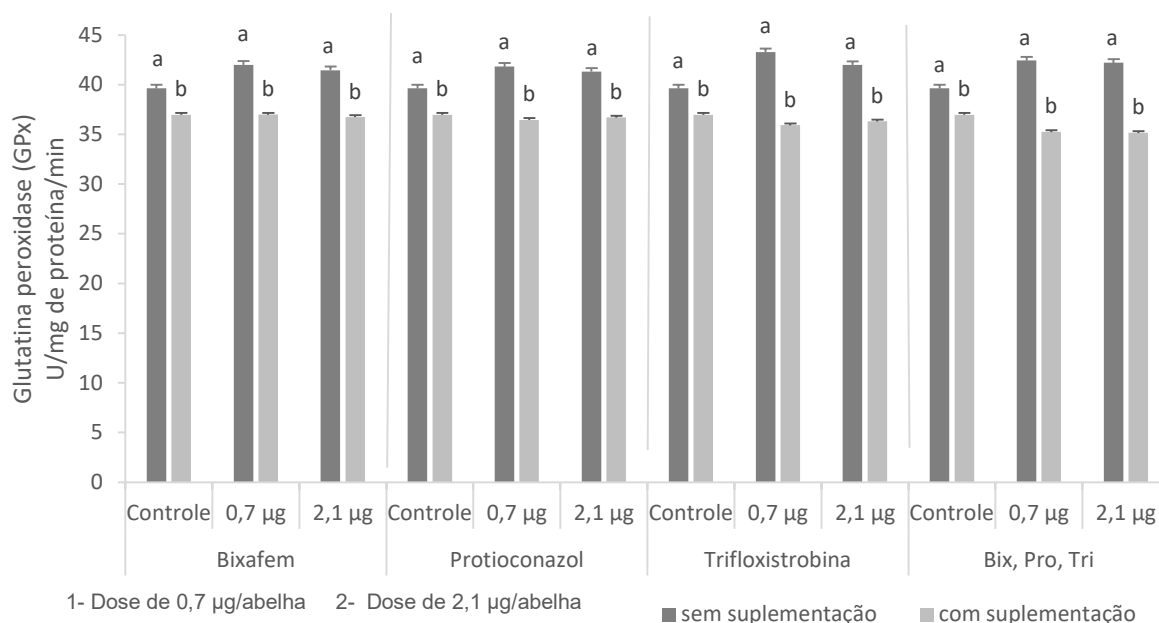


Figura 1. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, uma hora após a exposição por contato a bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou a combinação dos três fungicidas (bix, pro, tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 µg por abelha) e controle; abelhas de colônias que receberam ou não suplemento alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

5.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT), expressa em U/mg de proteína/minuto, apresentou alterações significativas ($p < 0,05$) em resposta à exposição aos fungicidas testados, com padrões distintos entre os grupos com e sem suplementação nutricional. No grupo sem suplementação, a atividade basal da CAT no controle foi de 3,5 U/mg de proteína/minuto. A exposição ao bixafen (0,7 µg) elevou a atividade para 4,4 U/mg, enquanto o protioconazol (0,7 µg) induziu um aumento mais pronunciado, atingindo 4,8 U/mg. O efeito mais marcante foi observado com a trifloxistrobina, que elevou a atividade enzimática para 5,6 U/mg em ambas as doses testadas (0,7 e 2,1 µg). A combinação dos três fungicidas (Bix, Pro, Tri) também aumentou a atividade da CAT, com valores de 4,4 U/mg (0,7 µg) e 5,5 U/mg (2,1 µg) (Figura 2).

Em contraste, no grupo com suplementação nutricional, a atividade basal da CAT no controle foi de 3,4 U/mg de proteína/minuto. O bixafen aumentou a atividade

para 4,0 U/mg (0,7 µg) e 4,7 U/mg (2,1 µg), enquanto o protioconazol reduziu significativamente a atividade para 3,0 U/mg (0,7 µg) e 3,2 U/mg (2,1 µg). A trifloxistrobina apresentou um efeito bifásico: na dose de 0,7 µg, a atividade foi drasticamente reduzida para 2,4 U/mg, enquanto na dose de 2,1 µg, manteve-se no nível basal (3,4 U/mg). A combinação dos fungicidas (Bix, Pro, Tri) resultou em valores de 3,0 U/mg (0,7 µg) e 2,2 U/mg (2,1 µg) (Figura 2).

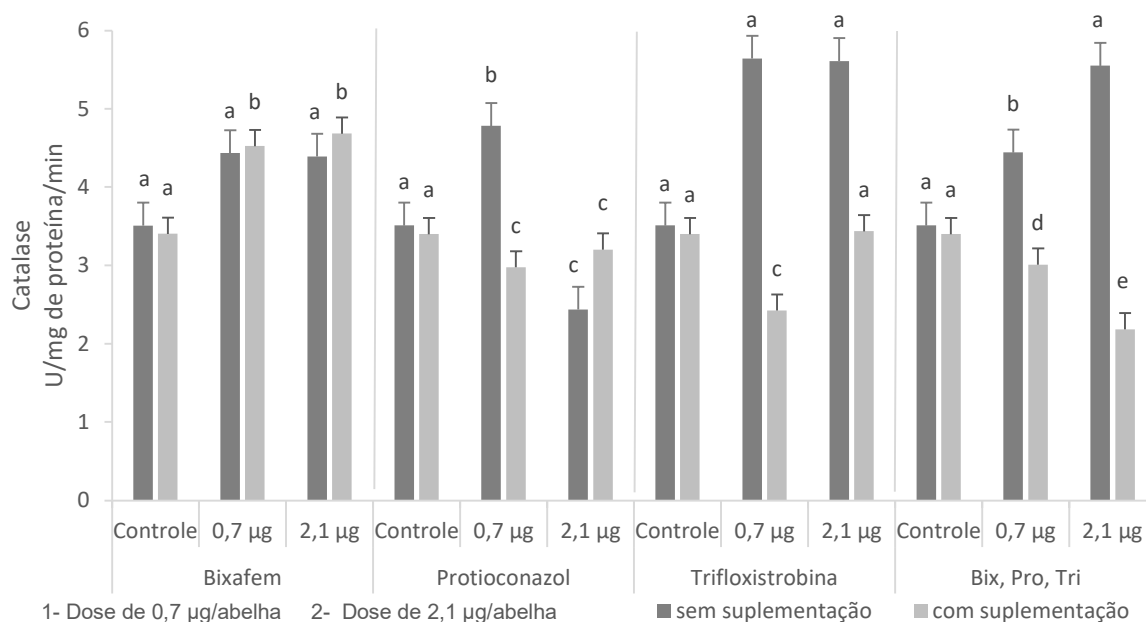


Figura 2. Atividade das enzima catalase (CAT) no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, uma hora após a exposição por contato a bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou a combinação dos três fungicidas (bix, pro, tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 µg por abelha) e controle; abelhas de colônias que receberam ou não suplemento alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

5.3.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica* uma hora após exposição por contato aos fungicidas, utilizando duas doses (0,7 e 2,1 µg/abelha), em colônias com e sem suplementação alimentar (Figura 3). No grupo sem suplementação (controle: 8,5 nmol/mg de proteína), a exposição ao bixafem resultou em níveis médios de GSH de aproximadamente 8,4 nmol/mg em ambas as doses, sem diferença estatística em relação ao controle. No caso do protioconazol, a dose de 0,7 µg reduziu

significativamente os níveis de GSH para 8,1 nmol/mg em relação ao controle, enquanto a dose de 2,1 µg (8,4 nmol/mg de proteína) não apresentou diferença significativa em comparação ao controle. Para a trifloxistrobina somente a dose 0,7 µg (8,2 nmol/mg de proteína) reduziu significativamente em relação ao controle. Em relação a combinação dos três fungicidas os valores em ambas as dosagens não diferiram significativamente em relação ao controle (Figura 3).

No grupo com suplementação (controle: 8,3 nmol/mg de proteína), os fungicidas provocaram aumento dos níveis de GSH. O bixafem elevou os valores para uma média de aproximadamente 8,7 nmol/mg de proteína (0,7 e 2,1 µg), apresentando diferença estatística em relação ao controle, mas não entre as duas doses. O protioconazol aumentou os níveis de GSH, registrando 9,0 nmol/mg de proteína na dose de 0,7 µg (diferença estatisticamente significativa vs. controle) e 8,5 nmol/mg de proteína na dose de 2,1 µg sem diferença estatística em relação ao controle. A trifloxistrobina (8,1 nmol/mg de proteína) não difere estatisticamente entre as doses e o controle, porém a combinação dos fungicidas na dose de 2,1 (8,5 nmol/mg de proteína) aumentou significativamente em comparação a dose 0,7 µg, porém sem apresentar diferenças entre as doses testadas e o controle (Figura 3).

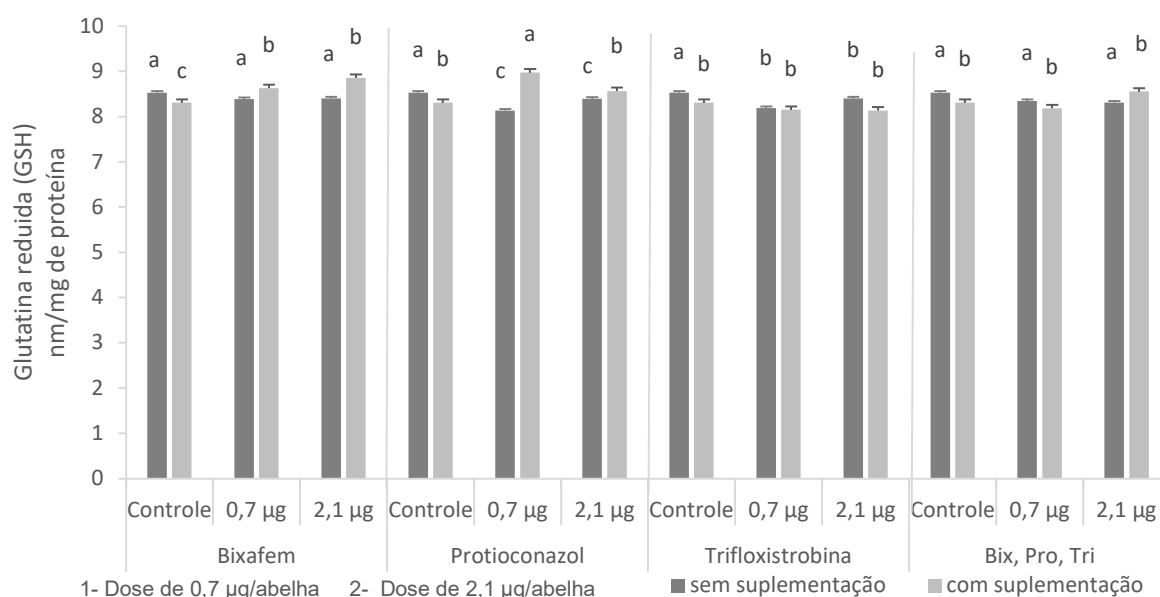


Figura 3. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, uma hora após a exposição por contato ao bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou a combinação dos três (Bix, Pro, Tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 µg por abelha) e controle; abelhas de colônias oriundas que receberam ou não suplemento alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

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

A atividade dos nucleotídeos de piridina, expressa em unidades relativas de fluorescência (URF), foi significativamente alterada pela exposição aos fungicidas, com respostas diferentes entre as colônias sem (SS) e com (CS) suplementação alimentar (Figura 4).

No grupo sem suplementação (controle: 57,4 URF), o bixafem, na dose de 0,7 µg, reduziu significativamente a atividade para 52,3 URF, enquanto a dose de 2,1 µg (58,6 URF) não diferiu do controle. Para o protioconazol, observou-se um efeito bifásico: a dose de 0,7 µg aumentou significativamente a atividade para 64,6 URF, mas a dose de 2,1 µg reduziu-na significativamente para 41,4 URF. De forma semelhante, a trifloxistrobina elevou significativamente a atividade para 66,8 URF na dose de 0,7 µg e reduziu-na para 41,9 URF na dose de 2,1 µg. Na combinação dos três fungicidas (Bix, Pro, Tri), ambas as doses (0,7 µg e 2,1 µg) produziram reduções significativas, com valores de 46,6 URF e 50,6 URF, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 4).

No grupo com suplementação (controle: 33,3 URF), os efeitos foram distintos. O bixafem aumentou significativamente a atividade para 48,6 URF (0,7 µg) e 58,8 URF (2,1 µg). O protioconazol, na dose de 0,7 µg, elevou significativamente a atividade para 59,2 URF, enquanto a dose de 2,1 µg (34,4 URF) não apresentou diferença estatística em relação ao controle. Quanto à trifloxistrobina, a dose de 0,7 µg aumentou significativamente os valores para 46,2 URF, mas a dose de 2,1 µg (49,4 URF) não diferiu estatisticamente do controle. Por fim, a combinação Bix, Pro, Tri reduziu significativamente a atividade para 32,5 URF (0,7 µg) e 28,5 URF (2,1 µg) quando comparada ao controle (Figura 4).

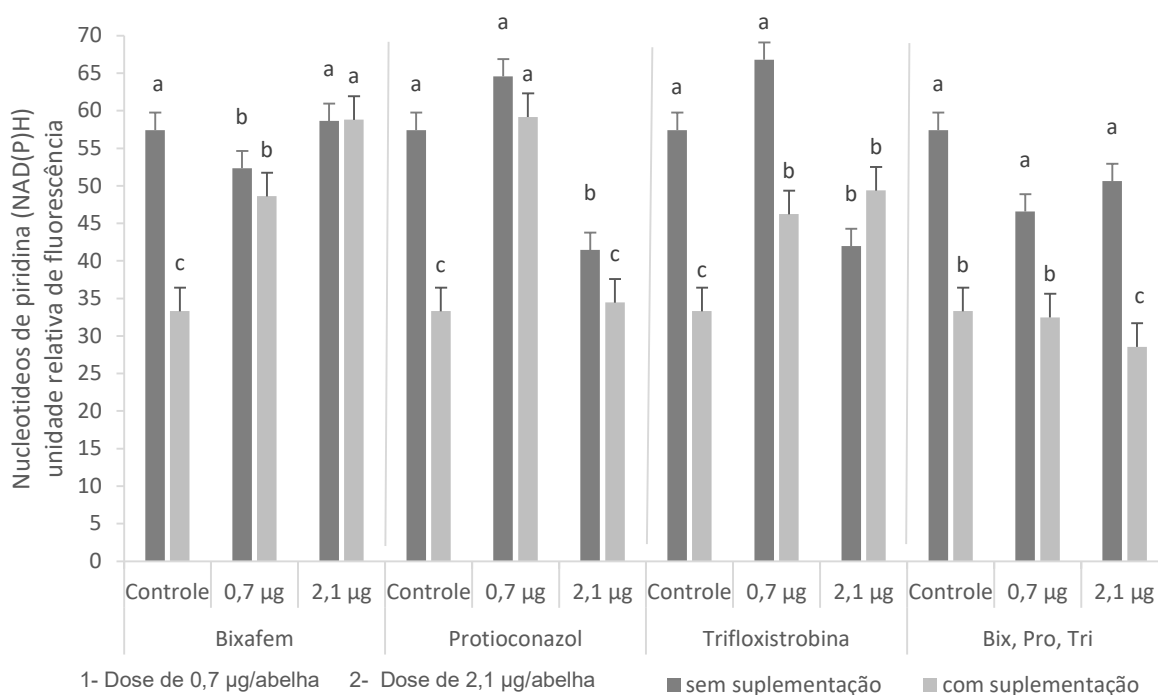


Figura 4. Concentração de nucleotídeo de piridina (NAD(P)H) no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, 1 hora após a exposição por contato ao Bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou os três em combinação (Bix, Pro, Tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 µg por abelha) e controle; abelhas de colônias com manejo alimentar sem suplementação (amarelo) ou com suplementação (laranja). Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação dos três (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

5.3.5 Avaliação da lipoperoxidação

A atividade de malondialdeído (MDA), indicador de peroxidação lipídica, foi avaliada em abelhas expostas aos fungicidas bixafem, protioconazol, trifloxistrobina e

sua combinação (Bix, Pro, Tri), considerando os grupos com e sem suplementação alimentar. Os valores médios foram relativamente consistentes entre os tratamentos, variando pouco em relação ao controle. No grupo sem suplementação alimentar, os níveis de MDA variaram de 0,11 a 0,12 nmol/mg de proteína para todos os fungicidas e suas doses, mostrando resultados similares ao controle (0,11 nmol/mg de proteína). As doses de 0,7 μ g e 2,1 μ g de bixafem e protioconazol, bem como trifloxistrobina e a combinação (bix, pro, tri), não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle (Figura 5).

Para o grupo com suplementação alimentar, os níveis de MDA mantiveram-se semelhantes ao controle (0,11 nmol/mg de proteína), com variações pequenas entre os tratamentos. As doses de 0,7 μ g e 2,1 μ g de bixafem e protioconazol apresentaram valores de 0,11 nmol/mg de proteína, enquanto a dose mais baixa de trifloxistrobina (0,7 μ g) apresentou uma pequena redução para 0,10 nmol/mg de proteína, embora estatisticamente não significativa (Figura 5).

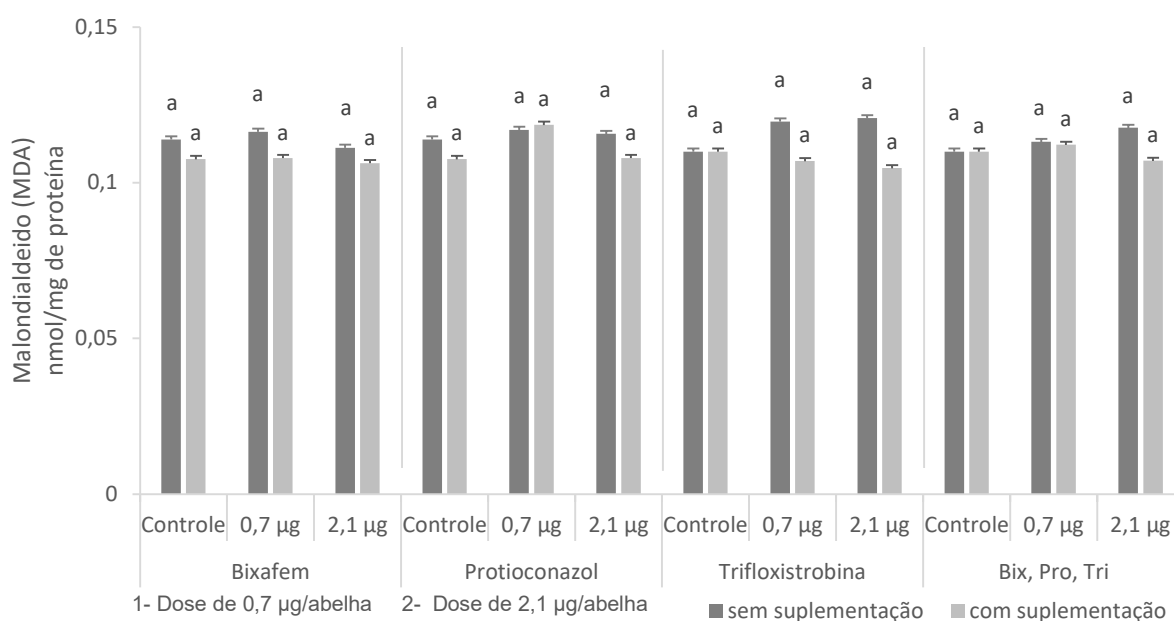


Figura 5. Determinação da lipoperoxidação no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, uma hora após a exposição por contato a bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou a combinação dos três fungicidas (bix, pro, tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 μ g por abelha) e controle; abelhas de colônias que receberam ou não suplemento alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a combinação (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

5.3.6 Avaliação da oxidação de grupos tióis de proteínas

No grupo sem suplementação alimentar, a adição dos fungicidas ao homogenato provocou alterações significativas na concentração de grupos tióis em comparação ao controle (2,13 nmol/mg de proteína). Para o bixafem, a dose de 0,7 µg elevou os níveis para 3,88 nmol/mg, enquanto a dose de 2,1 µg reduziu-os para 1,99 nmol/mg, ambos significativamente diferentes do controle. O protioconazol também apresentou diferenças significativas, com valores mais elevados na dose de 2,1 µg (4,47 nmol/mg) quando comparados ao controle (2,13 nmol/mg). Já a aplicação de trifloxistrobina aumentou os níveis de grupos tióis, atingindo 2,77 nmol/mg na dose de 0,7 µg e 5,05 nmol/mg na dose de 2,1 µg, valores também significativamente distintos do controle. A combinação de fungicidas (bix, pro, tri) também apresentou aumentos significativos em 2,1 µg (3,09 nmol/mg), enquanto a dose de 0,7 µg (2,49 nmol/mg) não mostrou diferença significativa em relação ao controle (Figura 6).

No homogenato das abelhas provenientes do grupo com suplementação alimentar, não foram observados aumentos significativos na atividade de grupos tióis em nenhum dos tratamentos. Em todos os casos, os valores ficaram consistentemente abaixo do grupo controle suplementado (0,63 nmol/mg). Para bixafen, as doses de 0,7 µg (0,46 nmol/mg) e 2,1 µg (0,61 nmol/mg) apresentaram reduções significativas em relação ao controle suplementado. Um padrão semelhante foi observado para trifloxistrobina, cujas doses de 0,7 µg (0,22 nmol/mg) e 2,1 µg (0,41 nmol/mg) apresentaram os menores valores de atividade entre todos os tratamentos (Figura 6).

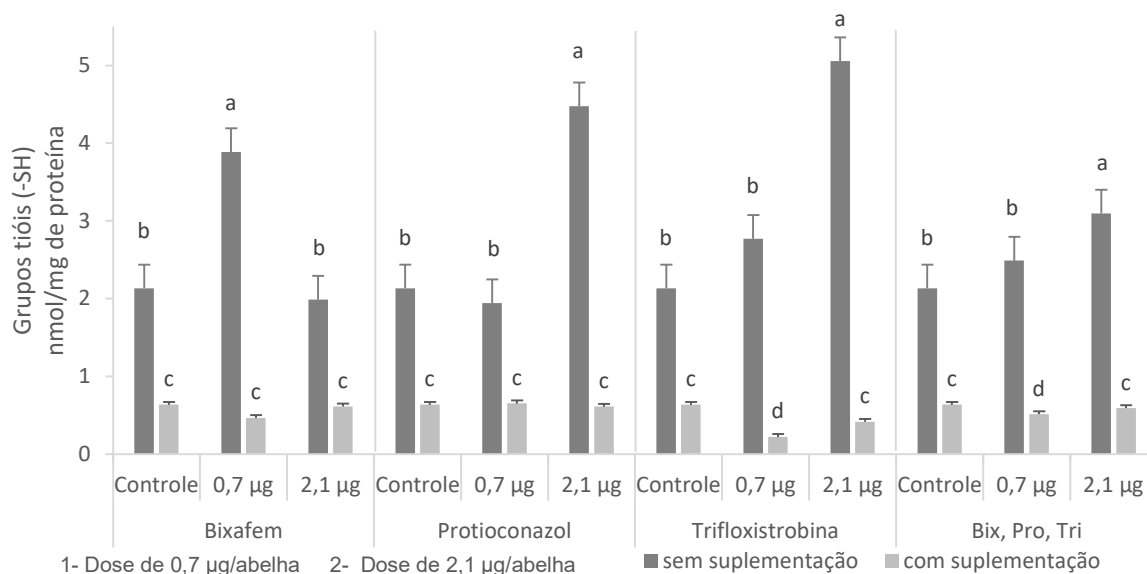


Figura 6. Avaliação da oxidação de grupos tióis de proteínas no homogenato do tórax de abelhas *Scaptotrigona postica*, uma hora após a exposição por contato a bixafem, protioconazol ou trifloxistrobina, ou a combinação dos três fungicidas (Bix, Pro, Tri), em duas concentrações (0,7 e 2,1 µg por abelha) e controle; abelhas de colônias que receberam ou não suplemento alimentar. Para cada parâmetro, as médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo p. a. e a mistura (três p. a.) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

5.4 Discussão

A defesa antioxidante em abelhas depende de uma rede integrada de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, fundamentais para mitigar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A GPx participa da detoxificação de hidroperóxidos lipídicos e outros peróxidos, enquanto a CAT decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, prevenindo o acúmulo de ERO (Aebi, 1974; Flohé; Günzler, 1984; Dolezal; Toth, 2018). Além disso, uma nutrição adequada é essencial para a manutenção e otimização desses sistemas, pois fornece os precursores para a síntese enzimática e modula a expressão gênica envolvida nas respostas ao estresse oxidativo (Ferraz, 2024).

É importante destacar que o presente estudo foi realizado com abelhas nativas, *Scaptotrigona postica*, enquanto muitos dos estudos referenciados utilizaram abelhas melíferas, *Apis mellifera*. Essa distinção é relevante, pois as respostas fisiológicas e metabólicas podem variar entre as espécies, influenciando a interpretação

comparativa dos dados (Brodschneider; Crailsheim, 2010; Nicolson; Human, 2013).

No presente estudo, a atividade da GPx não apresentou alterações estatisticamente significativas em abelhas expostas aos fungicidas, tanto em condições de suplementação quanto de restrição alimentar (doses de 0,7 e 2,1 µg por abelha). Embora estudos realizados com *Apis mellifera* tenham indicado que estresses oxidativos intensos podem reduzir a atividade da GPx (Balieira et al., 2018; Nicodemo et al., 2020; Schuhmann et al., 2021; Pal et al., 2022; Sule et al., 2022), os dados atuais sugerem que, nas doses empregadas, mecanismos compensatórios ou uma inerente resistência enzimática podem ter preservado sua função em *Scaptotrigona postica*.

Ademais, Wahl e Ulm (1983) já haviam discutido que a restrição alimentar pode comprometer a síntese e ativação de enzimas antioxidantes críticas. Em linha com esses achados, Schuhmann et al. (2022) observaram que o protioconazol pode interferir na via de detoxificação ao inibir as monoxigenases do citocromo P450, agravando os efeitos adversos. Essa perspectiva reforça a importância de uma nutrição adequada para manter os mecanismos de defesa enzimáticos.

Em contrapartida, a CAT foi significativamente modulada pela exposição aos fungicidas, embora de forma dependente do estado nutricional. No grupo sem suplementação (controle de 3,5 µmol/mg por minuto), fungicidas como o bixafem e o protioconazol na dose de 0,7 µg, bem como a trifloxistrobina em ambas as doses, induziram aumentos significativos na atividade da CAT, uma provável resposta adaptativa para neutralizar o excesso de H₂O₂. Já no grupo suplementado (controle de 3,4 µmol/mg por minuto), embora o bixafem continuasse a estimular a atividade, o protioconazol, a trifloxistrobina e a combinação destes demonstraram efeitos inibitórios ou mantiveram a atividade próxima aos valores basais, sugerindo que a suplementação promove uma homeostase mais estável e reduz a necessidade de respostas compensatórias intensas (Yazlovytska et al., 2023; Alves et al., 2024).

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) também evidenciou a influência do estado nutricional. Em abelhas sem suplementação (controle de 8,5 nmol/mg), fungicidas como o protioconazol e a trifloxistrobina na dose de 0,7 µg reduziram significativamente os níveis de GSH, indicando um comprometimento do sistema antioxidante. Em contraste, no grupo suplementado (controle de 8,3 nmol/mg), os

tratamentos com bixafem e protioconazol na dose de 0,7 µg promoveram aumentos significativos nos níveis de GSH, demonstrando o efeito protetor da dieta enriquecida. Essa diferença pode refletir a maior capacidade das abelhas bem nutridas de atender à demanda metabólica por antioxidantes e manter a integridade do equilíbrio redox (Alves et al, 2024; Freitas et al., 2024a).

Adicionalmente, a influência do estado nutricional se estende a outros aspectos fisiológicos. Estudos indicam que abelhas provenientes de colônias com restrição alimentar, especialmente durante a fase de cria, consomem menos alimento e, conseqüentemente, apresentam menor sobrevivência e desempenho reduzido em funções vitais, como o cuidado da cria e o forrageamento (Brodschneider; Crailsheim, 2010). Em contrapartida, abelhas que se desenvolvem em condições de alimentação adequada, conforme observado em estudos com *Apis mellifera* (Alaux et al., 2010; DeGrandi-Hoffman et al., 2018), demonstram maior eficiência na detoxificação e na manutenção dos mecanismos antioxidantes. A diversidade alimentar, promovida pela coleta em múltiplas fontes vegetais, proporciona uma dieta mais equilibrada e rica em metabólitos secundários com potencial ação protetora contra agrotóxicos (Vaudo et al., 2015; Palmer-Young et al., 2019; Ardalani et al., 2021).

Outros marcadores, como os níveis de malondialdeído (MDA) e os grupos tióis (SH), reforçam a importância da nutrição na manutenção da homeostase celular. A estabilidade dos níveis de MDA sugere proteção das membranas lipídicas, enquanto as variações nos grupos tióis indicam que uma dieta adequada fortalece as defesas endógenas (Balieira et al., 2018; Nicodemo et al., 2020; Alves et al., 2024; Freitas et al., 2024a). Além disso, fatores como o peso inicial e a longevidade das abelhas também são influenciados pelo manejo nutricional, sendo que abelhas provenientes de colônias com suplementação apresentam maior peso e sobrevivência (Kaznowski et al., 2005; Di Pasquale et al., 2013; Ihle et al., 2014). A disponibilidade de água, por sua vez, desempenha um papel complementar na imunidade e nos processos de detoxificação (Nearman e vanEngelsdorp, 2022).

Em síntese, os resultados deste estudo demonstram que a eficácia dos sistemas antioxidantes em *Scaptotrigona postica* é modulada tanto pela exposição aos fungicidas quanto pelo estado nutricional. Embora a atividade da GPx tenha permanecido inalterada, as variações na atividade da CAT e na concentração de GSH

evidenciam que uma suplementação alimentar adequada exerce um efeito protetor, promovendo a manutenção dos níveis basais e uma resposta antioxidante mais equilibrada. Esses achados reforçam a importância de considerar a qualidade nutricional – que inclui a diversidade e a qualidade do alimento, bem como o acesso a água – como um fator determinante na resistência das abelhas frente aos desafios ambientais e químicos, ressaltando ainda as diferenças entre *Scaptotrigona postica* e *Apis mellifera*.

5.5 Conclusão

A exposição a fungicidas modulou o sistemas antioxidante em *Scaptotrigona postica* de forma dependente do princípio ativo, da dose e do estado nutricional. A atividade da GPx não sofreu alterações, mas a CAT e os níveis de GSH foram significativamente impactados, com a suplementação alimentar demonstrando efeito protetor. Esses achados ressaltam a importância de uma nutrição adequada para mitigar os impactos dos agrotóxicos na saúde das abelhas.

Referências

- Aebi H (1974) Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.) Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, p. 673-684.
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6:562-565. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>>
- Alves TRR et al. (2024) Pollen contaminated with a triple-action fungicide induced oxidative stress and reduced longevity though with less impact on lifespan in honey bees from well fed colonies. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 112:104587. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104587>>
- Ardalani H, Vidkjær NH, Kryger P, Fiehn O, Fomsgaard IS (2021) Metabolomics unveils the influence of dietary phytochemicals on residual pesticide concentrations in honey bees. *Environment International* 152:106503. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106503>>
- Balieira KVB, Mazzo M, Bizerra PFV, Guimarães ARJS, Nicodemo D, Mingatto FE (2018) Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie* 49:562-572. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-018-0577-7>>

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

Bayer SA (2019) Fox Xpro: Fungicida. Agro Bayer. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protecaodecultivos/fox-xpro>>.

Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41(3):278-294. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/apido/2010012>>

Carneiro LS, Martínez LC, Gonçalves WG, Santana LM, Serrão JE (2020) The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target worker honey bees *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190:109991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>>

DeGrandi-Hoffman G et al. (2018) Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology* 109:114-124. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>>

Dolezal AG, Toth AL (2018) Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science* 26:114-119. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.013>>

Ferraz YMM (2024) Efeito da Nutrição e da Própolis Verde Sobre Aspectos Biológicos em Abelhas Melíferas Expostas ao Fungicida Fox Xpro. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Unesp, Jaboticabal. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/11449/256929>>

Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* 105:114-121. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)>

Freitas TA d. L et al. (2024a) Food supplementation does not prevent oxidative stress in forager honey bees exposed to the fungicides Bixafem, prothioconazole and trifloxystrobin. *Journal of Apicultural Research* 1-12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2406101>>

Freitas TAL et al. (2024b) Contact exposure of honey bees and social stingless bees to fungicide sprayed on cotton and soybean. *Journal of Applied Entomology* 148:861-869. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jen.13293>>

Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74:214-226. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)>

Hoskins DD, Cheldelin VH, Newburgh RW (1956) Oxidative enzyme systems of the honey bee, *Apis mellifera* L. Journal of General Physiology 39:705-713. Disponível em: <<https://doi.org/10.1085/jgp.39.5.705>>

Ihle KE, Baker NA, Amdam GV (2014) Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. Journal of Insect Physiology 69:49-55. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.026>>

Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Alves D de A et al. (2012) Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP. Disponível em: <<http://www.livrosabertos.edusp.usp.br/edusp/catalog/book/8>>

Kato AY, Freitas TAL, Gomes CRA et al. (2024) Bixafen, Prothioconazole, and Trifloxystrobin alone or in combination have a greater effect on health related gene expression in honey bees from nutritionally deprived than from protein supplemented colonies. Insects 15(7):523. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/insects15070523>>

Kaznowski A, Szymas B, Jazdzinska E, Kazimierczak M, Paetz H, Mokracka J (2005) The effects of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural Research 44:10-14. Disponível em:<<https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101139>>

Klein AM et al. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for global crops. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 274:303-313. Disponível em:<<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>>

Klein S, Cabirol A, Devaud JM, Barron AB, Lihoreau M (2017) Why bees are so vulnerable to environmental stressors? Trends in Ecology & Evolution 32:268-278. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.12.009>>

Lima YS (2023) O inseticida fipronil altera a expressão gênica em abelhas melíferas africanizadas. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Unesp, Botucatu. Disponível em:<<https://hdl.handle.net/11449/251222>>

Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR (2017) Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). Proceedings of the National Academy of Sciences 114:2538-2543. Disponível em:<<https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>>

Morimoto T et al. (2011) The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. Ecology and Evolution 1:201-217. Disponível em:<<https://doi.org/10.1002/ece3.21>>

Nearman A, vanEngelsdorp D (2022) Water provisioning increases caged worker bee lifespan. Scientific Reports 12:18660. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21401-2>>

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, et al. (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees *Environmental Toxicology and Chemistry* 39:1267–1272. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4719>

Nicolson SW, Human H (2013) Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie* 44:144-152. Disponível em:<<https://doi.org/10.1007/s13592-012-0166-5>

Pal E et al. (2022) Toxicity of the pesticides imidacloprid, difenoconazole, and glyphosate alone and in mixtures to winter honey bees. *Toxics* 10:104. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxics10030104>

Palmer-Young EC et al. (2019) Secondary metabolites from nectar and pollen. *Ecology* 100:e02621. Disponível em:<<https://doi.org/10.1002/ecy.2621>

Rondeau S, Raine NE (2022) Fungicides and bees: a review of exposure and risk. *Environment International* 165:107311. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>

Sanchez-Bayo F, Goka K (2016) Impacts of pesticides on honey bees. *Beekeeping and Bee Conservation* 77-97. Disponível em:<<https://doi.org/10.5772/62487>

SAS INSTITUTE (2020) SAS/STAT® 14.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schmehl DR et al. (2014) Pollen and diet composition significantly affect honey bee health. *PLoS ONE* 9:e86393. Disponível em:<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086393>

Schuhmann A et al. (2022) Interaction of Insecticides and Fungicides in Bees. *Frontiers in Insect Science* 1. Disponível em:<<https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>

Schulz DJ, Huang ZY, Robinson GE (1998) Effect of colony food shortage on the behavioral development of the honey bee, *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42:295-303.

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25:192-205. Disponível em:<[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215:213-219. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>

Soroye P, Newbold T, Kerr J (2020) Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. *Science* 367:685-688. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.aax8591>>

Sule RO, Condon L, Gomes AV (2022) A common feature of pesticides: Oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022:5563759. Disponível em:<<https://doi.org/10.1155/2022/5563759>>

Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* 10:133-141. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.008>

Wahl O, Ulm K (1983) Influence pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia* 59:106-128. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF00388082>

Yazlovytska LS et al. (2023) Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Frontiers in Ecology and Evolution* 11:1098350. Disponível em:<<https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1098350>>