

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

PRÓPOLIS NA DIETA DE ABELHAS *Apis mellifera* L. E SEU EFEITO
NO SISTEMA IMUNE, EXPRESSÃO DE GENES APÓS O DESAFIO
BACTERIANO E DETOXIFICAÇÃO FRENTE AO AGROQUÍMICO
FIPRONIL

EDISON ANTONIO DE SOUZA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Janeiro – 2016

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

PRÓPOLIS NA DIETA DE ABELHAS *Apis mellifera* L.E SEU EFEITO
NO SISTEMA IMUNE, EXPRESSÃO DE GENES APÓS O DESAFIO
BACTERIANO E DETOXIFICAÇÃO FRENTE AO AGROQUÍMICO
FIPRONIL

EDISON ANTONIO DE SOUZA
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

BOTUCATU - SP
Janeiro – 2016

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S73lp Souza, Edison Antonio de, 1985-
Própolis na dieta de abelhas *Apis mellifera* L. e seu efeito no sistema imune, expressão de genes após o desafio bacteriano e detoxificação frente ao agroquímico Fipronil / Edison Antonio de Souza. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 73 f. : tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Inclui bibliografia

1. Abelha - Criação. 2. Imunologia. 3. Própolis. 4. Expressão gênica. 5. Inseticidas. 6. Produtos químicos agrícolas. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Antonio Aparecido de Souza e Heloisa Casagrande de Souza, pelos ensinamentos, amor, apoio, investimento e estrutura necessária para que eu pudesse alcançar meus sonhos e objetivos. Sempre me orientando e torcendo por minhas vitórias e conquistas.

Às minhas irmãs, pelos momentos de descontração, amor, apoio e torcida.

À minha filha, Mariana Ayumi Narimatsu de Souza, por ser a luz que guia minha vida e torna qualquer obstáculo fácil de ser superado!

Amo muito vocês!!!!

Agradecimentos

À Deus, pela minha vida e pelos momentos que vivi , além de apoio e iluminação.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela paciência, amizade, ensinamentos, companheirismo e principalmente por todos esses anos de convivência que serviram para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Ary Fernandes Jr. do Instituto de Biociências de Botucatu pela ajuda para a execução do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia e todos os docentes, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Aos secretários da seção de pós-graduação, Seila Cristina Cassineli Vieira. Carlos Pazini Júnior e Ellen Guilhen , assim como os assistentes administrativos do Departamento de Produção Animal, Cláudio e Renato Agostinho Arruda, pelo apoio e dedicação nos seus serviços prestados.

A todo corpo docente e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, pelos ensinamentos, que serviram para meu crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Aos meus amigos de republica, Evelyn Abe, Thiago Piassa e Renata Lomele que sempre me descontraem, apoiam, aconselham e são da minha família Botucatuense! Amo vocês!

Aos amigos Guilherme Sicca Lopes Sampaio e Alessandra Vasconcellos por toda a ajuda prestada durante a execução do doutorado.

Aos meus ilustríssimos amigos da Apicultura: Marcela, Thais, Samir, Melina, Adriana, Rodrigo e Cinthia. Pela convivência, amizade, risadas, conselhos, ferroadas!

Aos companheiros de PBN, Leandro Melício e Guilherme Inocente pelas risadas e momentos de descontração inesquecíveis após futebol, Grande Abraço!

Ao funcionário Adriano, por toda a ajuda despendida.

A minha namorada Bruna Vitorino, que com certeza teve que aturar bons e maus momentos para que este momento fosse possível, só tenho a agradecer por todo apoio, noites mal dormidas, broncas e incentivos! Te amo!

Gostaria de agradecer a todos que não foram mencionados aqui, e que fizeram parte de todo este processo. Um Grande abraço em todos!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	01
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	02
1. Surgimento e evolução das abelhas	02
2. Histórico da apicultura no mundo e no Brasil	03
3. Importância da apicultura	06
4. Declínio das abelhas e outros polinizadores	08
5. Agrotóxico x Apicultura	09
6. Sistema imunológico dos insetos	12
7. Própolis	15
Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO II	31
INFLUÊNCIA DO CONSUMO DA PRÓPOLIS NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L. SUMETIDAS AO DESAFIO BACTERIANO	32
Resumo	32
Abstract	33
1. Introdução	34
2. Material e métodos	35
2.1. Local do experimento.....	35
2.2. Produção e extração da própolis.....	36
2.3 Colmeias utilizadas.....	36
2.4. Tratamentos	36

2.5. Coleta das abelhas	37
2.6. Bactéria	37
2.7. Infecção	38
2.8. Avaliações da expressão relativa dos genes relacionados à imunidade.....	38
2.9. Análise estatística	40
3. Resultados	40
4. Discussão	45
Referências	49
CAPÍTULO III	54
EFEITO DO CONSUMO DE PRÓPOLIS NO COMPORTAMENTO E MORTALIDADE DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L. SUBMETIDAS AO INSETICIDA FIPRONIL.....	55
Resumo	55
Abstract	56
1. Introdução	57
2. Material e métodos	58
2.1. Local do experimento.....	58
2.2. Produção e extração da própolis.....	58
2.3 Colmeias utilizadas.....	59
2.4. Tratamentos	59
2.5. Coleta das abelhas	59
2.6. Agrotóxico.....	60
2.7. Contaminação, alteração comportamental e teste de mortalidade	60
2.8. Teste de locomoção	61
2.9. Procedimento estatístico.....	62
3. Resultados	62
4. Discussão	65

Referências	69
Implicações	73

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo da expressão gênica de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas submetidas a desafio bacteriano	39
Tabela 2. Médias e desvio padrão da quantificação relativa dos genes <i>abaecin</i> , <i>hymenoptaecin</i> , <i>apidaecin</i> e <i>defensin1</i> nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 0, em relação ao tratamento controle.....	41
Tabela 3. Médias e desvio padrão da quantificação relativa dos genes <i>abaecin</i> , <i>hymenoptaecin</i> , <i>apidaecin</i> e <i>defensin1</i> nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 15, em relação ao tratamento controle.....	42
Tabela 4. Médias e desvio padrão da quantificação relativa dos genes <i>abaecin</i> , <i>hymenoptaecin</i> , <i>apidaecin</i> e <i>defensin1</i> nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 30, em relação ao tratamento controle.....	44

CAPÍTULO III

	Página
Tabela 1. Médias e Erro Padrão Médio (EPM) das taxas de mortalidade encontradas em abelhas <i>Apis mellifera</i> L. nos tratamentos contendo própolis (0, 5, 10 e 15%), após serem submetidas a diferentes doses de fipronil, ao longo do tempo.....	63
Tabela 2. Médias e Erro Padrão Médio (EPM) das taxas de mortalidade resultantes do consumo de diferentes doses de fipronil pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> L., ao longo do tempo	64
Tabela 3. Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas para percorrer 50 cm após exposição à DL ₅₀ e dose subletal (SL) do inseticida fipronil, nos tempos 1 e 4 horas, no dia 15 e 30.....	65

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Surgimento e evolução das abelhas

O registro geológico dos primeiros insetos ainda é incerto, o inseto mais antigo foi descoberto em rochas no período Carbonífero (Carpenter; Hermann, 1979) datadas de 350 milhões de anos atrás. As Ordens dos insetos presentes atualmente são as mesmas encontradas no final do período Paleozóico (Crane, 1999).

No início do período Cretáceo, as plantas com flores se estabeleceram e conseqüentemente surgiram insetos que eram associados às mesmas. Insetos encontrados no âmbar Báltico, agora considerado como o início da era Terciária, são um elo para os gêneros e espécies existentes (Carpenter, 1952; Danforth et al., 2006).

A superfamília Apoidea inclui todas as abelhas na qual as características são similares às vespas, apesar de que a ausência de um registro fóssil adequado tornou impossível a determinação de seu ancestral. Entretanto, em uma descrição sobre vespas do período Cretáceo relatou um espécime que era generalizado o bastante para ser considerado possível ancestral do Apoidea (Crane, 1999). Cardinal e Danforth (2013) realizaram um estudo que estima que as abelhas provavelmente se originaram entre 113 a 132 milhões de anos atrás. A primeira aparição das abelhas está ligada com a mudança do tipo de alimentação e da predação de insetos para obtenção do néctar e pólen de flores de angiosperma. Nas abelhas, a comida das larvas é derivada de secreções glandulares combinadas com néctar e pólen, obtidos de plantas floridas (Crane, 1999). Ribbands (1953) considera o desenvolvimento das glândulas para alimentação da cria em abelhas melíferas como uma característica discriminante quando comparada com seus parentes não sociais, o que indica que o alimento teve um papel importante na evolução das abelhas melíferas.

Geologicamente, as abelhas mais antigas e melhor preservadas foram encontradas em âmbar Báltico no Leste da Prússia e datam do período Eoceno, ou 50 milhões de anos atrás (Zander; Weiss, 1964). Essas abelhas apresentam características morfológicas parcialmente semelhantes com as encontradas atualmente em Meliponini e Apini.

As abelhas melíferas foram separadas por Maa (1953) em três gêneros e cerca de 28 espécies baseado em suas diferenças morfológicas. Estas diferenças morfológicas, entretanto, são geralmente consideradas como desvios das várias raças de abelhas, e assim o sistema de classificação do Maa não foi seguido amplamente (Crane, 1999).

O gênero *Apis* é aparentemente de origem tropical, mais provável na Índia e sudeste da Ásia, sendo ainda incluídas quatro espécies tradicionais: a abelha melífera gigante (*A. dorsata*), a pequena abelha melífera (*A. florea*), a abelha melífera oriental (*A. cerana*), e a abelha melífera ocidental (*A. mellifera*) (Butler, 1975; Lindauer, 1975; Koeniger, 1976).

A abelha melífera oriental (*A. cerana*) e a abelha melífera ocidental (*A. mellifera*) são duas espécies de abelhas que são muito semelhantes. Deodikar et al. (1959) sugeriu que a abelha *A. indica* (atualmente conhecida como *A. cerana*) evoluiu gradualmente em *Apis mellifera* e que durante sua passagem pelas três principais rotas migratórias do Himalaia diferenciou-se em um número de raças Africanas, Euroasiáticas, Sino-japonesas. Como a variedade de formas da *Apis mellifera* é extraordinariamente grande nas regiões do Mediterrâneo oriental e Cáucaso, acredita-se que o centro da origem desta abelha seja em algum local do Oriente.

2. Histórico da apicultura no mundo e no Brasil

É possível afirmar que encontramos abelhas melíferas (*A. mellifera*) em quase todas as partes do mundo, com exceção das regiões de extremo polar, mas nem sempre ocorreu desta forma. Até o século XVII as abelhas estavam confinadas no Velho Mundo (Europa, África e Ásia), onde evoluíram e foram amplamente distribuídas muito antes do surgimento do homem na terra. (Crane, 1999).

Ainda segundo Crane (1999), três eventos de grande significância na história das abelhas e da apicultura aconteceram na Europa no século XVII. Primeiramente foi o avanço das abelhas pelo mundo; antes de 1600, não havia abelhas no Novo Mundo, entretanto, colonizadores começaram a transportar as colmeias de abelhas pelos oceanos para essas regiões. As abelhas europeias provavelmente alcançaram a América do Norte pela Inglaterra, por volta de 1622 (Smith, 1988). Em torno de 1688 e 1689, as abelhas

européias foram levadas da França para St. Kitts e Guadalupe, no Caribe. Provavelmente por volta de 1822, foram levadas as primeiras abelhas para Austrália e na Nova Zelândia em 1839. As abelhas não foram introduzidas na costa leste da América do Norte até o início de 1850, quando foram introduzidas na Califórnia, partindo para o Oregon e posteriormente para a Colômbia Britânica.

O segundo acontecimento foi a descoberta de características sobre a biologia das abelhas melíferas. Em 1568, foi publicado na Alemanha um artigo elucidando o fato das abelhas poderem criar uma rainha a partir dos ovos ou de larvas muito novas. Em 1586, foi publicado um estudo descrevendo a rainha como fêmea responsável pela postura dos ovos e considerada a mãe de todas as abelhas da colônia (Crane, 1999). Então na Inglaterra em 1609, Charles Butler apresentou que os zangões eram os machos e Richard Remnant (1637) que as operárias eram fêmeas. Enquanto isso, na Itália Prince Cesi (1625) publicou os primeiros desenhos das abelhas vistas pelo microscópio. Os primeiros fatos sobre o acasalamento da rainha com o zangão só foram conhecidos em 1771 por Anton Janscha na Eslovênia (Crane, 1999).

Diversas outras descobertas sobre a biologia das abelhas ocorreram no século XVIII, tais como a verdadeira origem da cera de abelha, origem e coleta do pólen e néctar e principalmente, a importância das abelhas na fertilização das flores (Crane, 1999).

O terceiro acontecimento foi o desenvolvimento de técnicas de manejo na apicultura com a utilização de colmeias com melgueiras. Entre 1500 e 1851 apicultores, que utilizavam colmeias feitas em cestos de madeira, idealizaram formas de retirar o mel das colmeias sem matar as abelhas. Estes apicultores começaram a unir seus enxames e empilhar seus cestos de madeira, criando pequenos orifícios na parte esquerda do cesto superior. A partir de então, diversos apicultores começaram a desenvolver colmeias de madeira a fim de entender melhor as atividades das abelhas. Durante este período os apicultores das regiões com mais avanços estavam constantemente preocupados em desenvolver meios de obter um maior controle sobre essas abelhas, monitorando o que acontecia dentro do enxame, principalmente na área de cria (Fraser, 1958; Crane, 1999). Dentre as colmeias de madeira desenvolvidas no século XVII, deve-se ressaltar a “colmeia livro”. Desenvolvida por Francis Hubert em

Genève, esta colmeia apresentava 12 quadros móveis, sendo os dois quadros das extremidades cobertos em madeira, contendo espaços calculados que induziam as abelhas a puxarem apenas um favo por quadro. Desta forma, uma vez que fechada as abelhas só podiam sair ou entrar por um pequeno orifício retangular, existente na parte inferior dianteira do sexto quadro, permitindo então a observação da “página” desejada (Crane, 1999; Wiese, 2005).

Apenas em 1851 ocorreu o passo principal no desenvolvimento das colmeias de madeira, criada por Lorenzo Lorraine Langstroth, a colmeia langstroth foi desenvolvida a partir do estudo e observação da colmeia de Hubert. Langstroth percebeu que estes insetos respeitavam um espaço referente a duas abelhas trabalhando em favos opostos, sem solidificar os favos. Então imaginou que reservando um espaço correspondente a uma abelha em toda a volta interna da colmeia, as abelhas não solidificariam os favos à parede lateral, sua ideia estava correta e desde então se definiu esta medida como “espaço abelha”. A partir de então desenvolveu uma colmeia totalmente padronizada com quadros retangulares móveis, que lado a lado possuem uma abertura de 0,9mm tornando o manejo dos enxames facilitado. Suas colmeias se tornaram famosas nos Estados Unidos e em poucos anos foram levadas para Europa e conseqüentemente para todo o mundo. Com o uso de sua colmeia a apicultura moderna começou o seu desenvolvimento no século seguinte, apresentando um crescimento superior aos séculos anteriores (Crane, 1999; Wiese, 2005).

A atividade apícola no Brasil teve início em 1839, graças ao padre Antônio José Pinto Carneiro que conseguiu autorização do Rei D. Pedro II para trazer os primeiros enxames de abelhas *Apis mellifera mellifera* para a Praia Formosa, no estado do Rio de Janeiro, para a formação do apiário Imperial. Após 40 anos, algumas famílias de abelhas italianas (*Apis mellifera lingustica*) foram importadas pelo imigrante Frederico Hanemann e posteriormente outros imigrantes trouxeram raças cárnicas, caucasianas e italianas, disseminando as abelhas em todo território nacional (Wiese, 2005).

Devido às condições propícias do território nacional, como clima e floradas diversificadas, o manejo e produção apícola podem ser realizados durante o ano todo, o que facilitou o crescimento da apicultura nacional desde o princípio (Couto e Couto, 2002). Entretanto foi devido à introdução acidental das abelhas africanas (*Apis mellifera*

scutellata) em 1957, que a apicultura nacional teve um avanço produtivo e tecnológico. As abelhas africanas foram trazidas ao país em 1956 na região de Rio Claro - SP, com intuito de se executar um programa de melhoramento genético para aumentar a produção de mel. Porém, no ano seguinte 26 enxames, com suas respectivas rainhas, escaparam da quarentena e iniciaram um processo de cruzamentos naturais com as abelhas melíferas presentes na natureza, gerando populações poli híbridas, denominadas abelhas africanizadas (Mello et al., 2003).

Tal incidente provocou grandes mudanças na nossa apicultura, bem como na apicultura de vários países por onde os híbridos africanizados passaram posteriormente, com sérios impactos, tanto positivos (tais como aumento de produtividade, resistência a doenças, dentre outros) como negativos (maior defensividade, aumento no número de acidentes com abelhas, casos de morte de animais e pessoas) que motivaram e ainda motivam muitas polêmicas. Estas abelhas se disseminaram por quase toda a América do Sul, com exceção apenas do Chile, América Central, sul dos Estados Unidos e na região da Califórnia. Devido às suas características, elas auxiliaram o Brasil a se destacar no cenário apícola mundial (Gonçalves, 2004).

3. Importância da apicultura

Diversos produtos de interesse industrial são provenientes das abelhas melíferas, como o mel, própolis, o pólen, veneno, cera, geleia real e o serviço de polinização.

Mundialmente, o mel é o produto mais produzido e conhecido atualmente; até 2013 destacavam-se dentre os quatro maiores produtores a China, a Turquia, a Argentina e a Ucrânia (466, 94, 80, 73 mil toneladas respectivamente). Neste mesmo ano, o Brasil apresentou uma produção de aproximadamente 35 mil toneladas rendendo um valor econômico de aproximadamente R\$ 263 milhões, Entretanto, foi observada uma redução na produção de mel em 14% quando comparado com o ano de 2011, ano no qual ocorreu a maior produção nacional com aproximadamente 41 mil toneladas (Faostat, 2015; Ibge, 2015).

Apesar de o mel ser o principal produto originado pelas abelhas, o serviço de polinização é apontado como um dos mais valiosos, sendo evidenciada a sua

importância para a humanidade (Freitas; Fonseca, 2005; Gallai et al., 2009). Diversos polinizadores desempenham um papel importante na maioria dos ecossistemas terrestres, contribuindo na manutenção tanto de plantas silvestres (Ashamn, 2004; Aguilar, 2006; Ollerton et al., 2011) quanto as de produção agrícola (Klein, 2007; Ricketts, 2008).

As abelhas melíferas e nativas são os principais polinizadores da maioria das plantas silvestres e de interesse agrícola, colocando-as no centro de diversas discussões e debates sobre o futuro das fontes de alimentos de origem vegetal, como também em estudos econômicos. No Canadá estima-se que o valor da polinização da alfafa seja de 6 milhões de dólares anuais, no Reino Unido a estimativa é de 400 milhões de libras anuais, e o estudo mais recente sobre o valor da polinização no mundo, estima um montante de 153 bilhões de euros anuais (Kevan; Phillips, 2001; Gallai et al., 2009; Potts, 2010). Estes valores são referidos ao serviço de polinização prestado pelas abelhas em culturas comerciais, ressaltando que as abelhas também realizam esse serviço em espécies silvestres promovendo assim a biodiversidade, os chamados serviços de ecossistema, possuindo um valor estimado de 33 trilhões de dólares anuais (Costanza et al., 1997).

Diversos trabalhos verificam os benefícios do uso das abelhas na polinização de culturas comerciais, tais como girassol, canola, laranja, melão, café, acerola dentre outros, sendo evidenciada melhoria em diversos parâmetros tais como, aumento no teor de óleo, número de sementes, produção de frutos, uniformidade dos frutos, aumento no número de vagens e até viabilidade de produção, como no caso da cultura do meloeiro (*Cucumis melo*) e da maçã (*Mallus comunis*) que na ausência das abelhas a produção é inexistente (Potts et al., 2010; Breeze et al., 2011).

No Brasil, existem poucos estudos que elucidam a necessidade e impacto econômico da polinização, sendo encontrados dados voltados para as culturas do melão, café, laranja, soja, algodão, caju e maçã (Malerbo-Souza et al., 2003, Chiari et al., 2005). Giannimi et al., (2015) ao revisarem a dependência das culturas agrícolas por polinizadores, verificaram que dentre as 141 culturas analisadas, 85 demonstraram ser dependentes aos polinizadores e estimaram que o impacto econômico dessas abelhas seria de 12 bilhões de dólares.

É preciso ressaltar que a maior parte dos alimentos básicos do mundo é polinizada pelo vento, autopolinizados, e, por tal fato, alguns autores afirmam não haver preocupação com a produção de alimentos caso haja um declínio de polinizadores (Richards, 2001; Ghazoul, 2005). Entretanto, a produção moderna de culturas comerciais esta cada vez mais dependente da polinização realizada por polinizadores externos, como as abelhas *Apis mellifera*, que contribuem atuando de modo sinérgico com os polinizadores silvestres existentes na região periférica dos campos de plantação e assim resultam em uma polinização mais eficiente (Klein et al., 2003; Hoehn et al., 2008; Albrecht et al., 2012; Brittain et al., 2013; Garibaldi et al., 2013), o que ressalta a importância destas abelhas e reforça a preocupação recente com o declínio deste e outros polinizadores.

4. Declínio das abelhas e outros polinizadores

Nos últimos anos tem sido constatada uma crescente diminuição no número de polinizadores e conseqüentemente sendo instaurada uma preocupação mundial. De fato, preocupações com a estabilidade dos serviços de polinização têm existido desde que fora estabelecido o conceito de serviços de ecossistema, que refere-se ao subconjunto de funções do ecossistema que são úteis aos seres humanos (Buchman; Nabhan, 1996). O declínio destes insetos têm sido bem documentado e com recentes evidências que comprovam a diminuição da população de polinizadores silvestres (Potts et al., 2010) assim como também o número de colmeias de abelhas melíferas tem decrescido em diversos países (VanEngelsdorp et al., 2010). Embora desde 1961 o número de colmeias tem aumentado regionalmente em torno de 45%, a área de plantações dependentes da polinização por insetos cresceu no mesmo período cerca de 300% (Aizen; Harder, 2009). No período entre 1947 a 2005 foram observados uma redução na população das abelhas melíferas de 59% nos Estados Unidos e na Europa um declínio de 25% entre 1985 a 2005 (Potts et al., 2010; Bernal et al., 2011). Alguns autores têm relacionado este declínio a chamada CCD (“Colony Collapse Disorder”) ou como é conhecida no Brasil, Distúrbio de Colapso das Colônias (DCC). A DCC se caracteriza pela grande perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou

proximidades da colmeia, presença de alimento dentro do ninho e abandono das crias e rainha. Vista primeiramente nos Estados Unidos da América em 2006, a DCC já foi identificada na Alemanha, Suíça e Península Ibérica, sendo atribuídas perdas de até 90% dos enxames (Cox-Foster et al., 2007; Souza, 2009; Ellis, 2010).

Muitos fatores estão sendo relacionados ao declínio das abelhas *Apis mellifera*, não podendo ser definido apenas um, mas sim, uma possível sinergia entre eles (Pereira, 2010). Dentre as diversas possíveis causas apontadas estão; a ocorrência de doenças; aumento na infestação de parasitas, como o *Varroa destructor*; má nutrição; queimadas e desmatamento de vegetações nativas; implementação inadequada de cultivo agrícola; mudanças climáticas; aumento das áreas de monocultura; uso abusivo de agrotóxicos dentre outros (Freitas; Pinheiro, 2010; 2012). Além de diversas especulações de outros possíveis fatores como a radiação emitida por telefones celulares, cultivo de culturas geneticamente modificadas, avanço da urbanização, dentre outros.

Entretanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos nas plantações tem sido o principal foco das pesquisas atualmente (Ratnieks e Carreck, 2010), pois este uso tem selecionado indivíduos que se tornam mais resistentes aos princípios ativos utilizados e conseqüentemente gerando populações de pragas mais resistentes que por fim estimulam a combinação de substâncias ainda mais tóxicas e nocivas ao meio ambiente e seus polinizadores (Pereira, 2010).

5. Agrotóxicos x Apicultura

Por definição os agrotóxicos são substâncias químicas destinadas a controlar, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico nocivo às plantas, animais úteis e também ao ser humano (Peres et. al, 2003). Estas substâncias cumprem seu papel de proteção aos cultivos agrícolas, entretanto, quando dispersados no ambiente, podem ser extremamente prejudiciais, ocasionando possíveis alterações na dinâmica natural de pressão de seleção exercida sobre os organismos e conseqüentemente mudanças no ecossistema (Spadotto, 2006).

Apesar disto, a produção mundial de agrotóxicos como os pesticidas cresceu nas últimas décadas e é prevista para mais que o dobro da atual em 2050 com

aproximadamente 10 bilhões de toneladas métricas (Tilman et al., 2001; Wagner, et al., 2010). O uso de agroquímicos associados com o aumento de áreas agrícolas tem sido apontado como fatores chave de pressão nos polinizadores (Kuldna et al., 2009).

Dentre os pesticidas, os inseticidas representam o maior risco direto para os polinizadores e diversos trabalhos demonstram seus impactos negativos tanto em *Apis mellifera* (Shires et al., 2006; Desneux et al., 2007) como em outras abelhas (Gels et al., 2002). Os polinizadores podem ser expostos aos inseticidas durante sua aplicação, por contato com os resíduos, pela ingestão de pólen, néctar ou fluido (gotas de orvalho, ou floema) contaminado. O aumento no uso de neonicotinóides significa que há um grande potencial para os polinizadores serem expostos durante longos períodos tendo em vista que os inseticidas sistêmicos podem ser encontrados no néctar e pólen das plantas durante seu período de florescimento (Ellis, 2010).

O efeito dos inseticidas sobre a fauna de polinizadores tem sido evidenciado, sendo diretamente responsável pela redução das populações de abelhas, da produção apícola e indiretamente pelas perdas na produção de diversas culturas agrícolas (Freitas; Pinheiro, 2012). A exposição prejudica o comportamento de forrageamento das abelhas (Colin et al., 2004), reduz a longevidade das operárias e da rainha (Pettis et al., 2004), afeta a vitalidade da colônia (Belien et al., 2009), dentre outras alterações comportamentais e fisiológicas das colônias (Deusneux et al., 2007), como também individualmente na apresentação de tremores, paralisias e convulsões (Aliouane et al., 2009; Gregorc; Ellis, 2011).

Segundo Souza (2009), foi registrada na França, perdas de até 40% das colmeias decorrente do uso de fenilpirazóis em cultivos agrícolas. A redução de colônias de abelhas *Apis mellifera* e a contaminação do ambiente na França, Itália, Alemanha e Eslovênia, após a liberação do uso de inseticidas fenilpirazóis, levaram a esses países a proibirem sua utilização a partir de 1999 (Ghisi et al., 2011). Entretanto, no Brasil a utilização destes agroquímicos tem crescido anualmente e em 2008 assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos, consumindo 730 milhões de toneladas (Lira, 2010).

O principal componente ativo dos fenilpirazóis é o inseticida fipronil, que tem como característica a alta persistência no ambiente. Este inseticida foi sintetizado pela

Rhône Poulenc Ag Company, atual Bayer Crop Science em 1987, lançado em 1993 e registrado nos EUA em 1996 (Ware, 2000).

No Brasil, este inseticida é autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA para comercialização em diversas formulações e tipos, dentre elas, isca granulada de aplicação terrestre para controle de formigas - Blitz® (0,03/kg); suspensão concentrada utilizada no tratamento de sementes - Standak® (250g/L); granulado para aplicação no solo - Regente® 20 G (20g/kg); granulado para aplicação terrestre e aérea - Regente® 800WG (800g/kg); suspensão concentrada para aplicação terrestre e aérea - Klap® (200g/L). Sua utilização tem como finalidade o controle de pragas nas culturas de algodão, arroz, batata, cana de açúcar, milho, soja, cevada, feijão, trigo, pastagens e eucalipto (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014).

Na União Europeia, a taxa de aplicação deste inseticida varia entre 17,5 e 44g/i.a/ha e amostras de pólen que receberão essa quantidade de ingrediente ativo apresentaram respectivamente 2,3 e 6,4 fipronil kg⁻¹ (European Food Safety Authority, 2013). No caso dos países da América do Sul o uso do fipronil apresenta números ainda maiores, sendo autorizado para algumas culturas doses entre 80 a 400g/i.a/ha (BASF, 2014).

Para a apicultura mundial, estes dados são alarmantes, uma vez que diversos autores observaram dose letal (DL₅₀) de 50% da população de abelhas por ingestão com o fipronil variável de 0,00327 a 0,23 µg/abelha e por contato entre 0,000157 a 0,013 µg/abelha (Souza, 2009; Bovi, 2013). As diferenças nos valores de DL₅₀ para um mesmo agrotóxico são atribuídas a diversos fatores que podem influenciar no teste, como variabilidade genética das abelhas, variações climáticas locais e manipulação do pesquisador (Pereira, 2010).

Devido à sua ação sistêmica, o fipronil pode ocasionar outros danos além dos efeitos agudos, prejudicando o desenvolvimento e a sobrevivência de enxames de abelhas em casos de exposição crônica a doses subletais (Trapp; Pussemier, 1991; Johnson et al., 2010). Outros autores também relatam os danos ocasionados por doses subletais de fipronil em *Apis mellifera*, tais como, percepção olfativa e aprendizado olfatório afetado (importantes no comportamento de forrageamento), e imobilidade ou movimento dificultado (Aliouane et al., 2009; Cruz et al., 2010).

Além disto, os agrotóxicos podem interagir com outros agentes patogênicos presentes nas colmeias ou ambiente e contribuir para prejudicar a saúde das abelhas (van Engelsdorp et al., 2009; Johnson et al., 2010). Diversos autores realizaram estudos utilizando agrotóxicos conjuntamente com agentes estressores externos (parasitas, vírus, bactérias) constatando um efeito sinérgico entre eles, sendo observadas alterações negativas, como a redução na sobrevivência das abelhas (principalmente recém-emergidas), maior susceptibilidade ao ataque do ácaro *Varroa destructor*, como também ao parasita *Nosema ceranea*, além de prejuízos na organização social da colônia, o que as torna mais susceptíveis ao aparecimento de outras doenças (Aufavre et al., 2012; Pettis et al., 2013). Outro dano interessante descoberto foi relatado por Greccor et al., (2012). Neste estudo os autores demonstraram que as abelhas aumentam a expressão de genes relacionados ao reconhecimento de parasitas, no caso, a presença de *Varroa destructor*. Entretanto, quando essas abelhas eram expostas aos agrotóxicos juntamente com o ácaro, foi observado que não houve alteração na expressão gênica, implicando assim uma redução na resistência das abelhas contra parasitas e doenças, ou seja, causando impactos no sistema imunológico das mesmas.

6. Sistema imunológico dos insetos

O sistema imune dos insetos ainda apresenta muitos aspectos que precisam ser estudados e elucidados. Os insetos, ao contrário dos vertebrados, não apresentam um verdadeiro sistema imune adaptativo, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas (*Ig-like protein*) tenham sido encontradas (Wu et al., 2002). A resistência a doenças nos invertebrados se baseia no sistema inato de defesa, que inclui a síntese de peptídeos antimicrobianos, proteinases inibidoras, moléculas de adesão celular, ou seja, uma série de reações celulares e humorais coordenadas (Luo et al., 2003; Jiang, 2008).

A reação humoral é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e resulta, principalmente, da ação de proteínas (Amaral, 2009). Entre as moléculas efetoras mais importantes do sistema humoral, estão os peptídeos antimicrobianos, responsáveis pela inibição da biossíntese de proteínas da membrana externa de bactérias e que são produzidas por diversos tecidos, inclusive o tecido adiposo (Tzou et al., 2002). Além disso, existem mecanismos humorais de defesa que

incluem a síntese ou ativação de imuno-proteínas, como a lisozima e a fenoloxidase, além de imuno-peptídeos tais como as cecropinas e apidecinas (Cremonez, 2001).

A genética molecular tem emergido como um outro meio de verificação da imunidade dos insetos. O projeto que sequenciou o genoma das abelhas (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) e outras pesquisas (Evans; Wheeler, 2000; Robinson et al., 2005), forneceram um número significativo de novas fontes de possíveis genes que podem auxiliar em melhor entendimento do funcionamento genético das abelhas. As funções desses genes podem ser avaliadas por métodos de genética quantitativa (e.g., QTL; or Quantitative Trait Loci, Lobo et al., 2003), estudos de silenciamento gênico (Lourenço et al., 2005) e de expressão gênica (Kucharski; Maleszka, 2003; Johansson et al., 2005).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real (qPCR) está sendo amplamente empregada no estudo de alteração na expressão de genes em *A. mellifera*. A técnica de PCR em tempo real é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação em todos os ciclos de uma reação (Ginzinger, 2002).

Boncristiane et al. (2012) estudaram o impacto que o ácaro *V. destructor* e os acaricidas utilizados em seu controle causam sobre as abelhas *A. mellifera*. Neste estudo foram selecionados 50 genes que atuam em diversos níveis metabólicos como relacionados à imunidade, desenvolvimento e desintoxicação. As colmeias foram tratadas com cinco diferentes acaricidas (Apiguard, Apistan, Checkmite, Miteaway e ApiVar) que alteraram a expressão dos genes relacionados à resposta imune, desenvolvimento e desintoxicação.

Zhang et al. (2010) estudaram genes relacionados aos processos metabólicos e sinalização nervosa em *A. mellifera* e *A. cerana* submetidas à infestação por *V. destructor*. Foram feitas reações de qPCR, utilizando oligonucleotídeos para oito genes, para estudar a resposta molecular destas abelhas diante da infestação por *V. destructor*. Foram encontrados diferentes níveis de expressão destes oito genes nas duas espécies de abelhas, possibilitando ter um desenho da resposta molecular à infestação por *V. destructor*.

Dentre outros estudos que avaliaram a expressão de genes relacionados à imunidade em abelhas *Apis mellifera*, os genes comumente estudados são a *abaecin*, *apidaecin*, *defensin1*, *defensin2* e *hymenoptaecin* (Evans; Pettis, 2005; Evans et al., 2006; Lourenço 2007).

A Abaecina é um peptídeo de 34 aminoácidos contendo 34% de prolina e que possui domínios na sequência similares à Dipterocina encontrada em moscas. Apesar de similaridades encontradas entre apidaecina, abaecina e dipterocina A, as propriedades biológicas entre elas são bastante diferentes. A abaecina é mais ativa contra bactérias Gram-negativas e também Gram-positivas. (Casteels et al., 1990).

As Apidaecinas são peptídeos curtos (18 aminoácidos) altamente ativos contra bactérias Gram-negativas, provavelmente por destruir a parede celular. Esse peptídeo é encontrado principalmente nas fases larvais e adultas, que parecem mais desprotegidas e é ativado quando as abelhas são imunizadas com bactérias patogênicas de plantas, sugerindo que esses insetos desenvolveram um mecanismo específico contra microrganismos presentes no ambiente em que eles vivem (Casteels et al., 1989).

As Defensinas são codificadas por dois genes: a *defensin1* e a *defensin2* que codificam uma nova Defensina não caracterizada, cujo papel na fisiologia da abelha ainda precisa ser investigado. O peptídeo codificado como *defensin1* consiste de 51 aminoácidos. Já o peptídeo codificado pela *defensin2* tem 43 aminoácidos e não contém uma extensão C-terminal, encontrada em outras defensinas de himenópteros (Klaudiny et al., 2005). A hymenoptaecina é o maior peptídeo antimicrobiano conhecido em *Apis*, com 94 aminoácidos, que age contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Casteels et al., 1993).

A quantificação de transcritos para esses peptídeos tem sido feita em larvas após inóculo com vários tipos de bactérias (Evans, 2004; Evans;Lopez, 2004; Lourenço,2007) e também em adultos com inóculo de *Escherichia coli* (Casteels-Josson et al., 1993, 1994). A variação na transcrição de peptídeos também foi utilizada para a avaliação da inibição do sistema imune da *A. mellifera* devido à presença do ácaro *V. destructor*, um ectoparasita de abelha (Gregory et al., 2005; Yang;Cox-Foster, 2007).

7. Própolis

Historicamente, a própolis sempre foi considerada um produto de propriedades especiais para a saúde humana (Burdock, 1998; Lustosa et al., 2008; Righi, 2008; Mendonça, 2011), sendo seu uso relatado por médicos romanos e gregos como Galeno, Aristóteles, Plínio e Dioscórides que reconheceram as suas propriedades medicinais, tais como cicatrizante e antisséptico no tratamento de feridas e desinfecção bucal (Righi, 2008; Barbosa, et al., 2009).

Nos anos de 1950 e 1960, a própolis começou a ser empregada no tratamento de problemas de saúde em alguns países do leste da Europa (Polônia e República Tcheca) e em 1980, em países situados no oeste da Europa, Américas do Sul e Norte e o Japão (Lustosa et al., 2008). Ainda na metade da década de 80, se tornou importante na medicina complementar e alternativa, sendo atualmente usada na indústria farmacêutica (Lustosa et al., 2008; Mendonça, 2011).

A própolis é uma substância resinosa, pegajosa, elástica, aromática e de coloração variada, obtida pelas *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão a partir de líquidos secretados no desenvolvimento inicial de botões florais e foliares e exsudados vegetais (Simões et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2009; Cottica et al., 2011). As abelhas ainda adicionam enzimas das secreções salivares, como a β -glicosidase que hidrolisa os flavonoides glicosilados a agliconas, e acrescentam cera, que torna a substância moldável (Simões et al., 2008; Cueto et al., 2011; Dias et al., 2012).

A própolis pode ser originada de uma extensa diversidade de espécies vegetais, como os gêneros *Eucalyptus* (Montenegro et al., 2001), *Populus* (*P. alba*, *P. nigra* e *P. tremula*) (Bankova et al., 2002; Adelman et al., 2007), *Baccharis* (Park et al., 2004; Bankova, 2005). Estes relatos merecem destaque, uma vez que, em função da flora local, alguns componentes químicos podem ser encontrados em menor ou maior concentração, ou mesmo estarem ausentes em uma das amostras, podendo refletir em atividades biológicas diferentes.

A composição da própolis é complexa, sendo que foram identificadas mais de 300 substâncias diferentes (Burdock, 1998; Bankova et al., 2002). O maior grupo de compostos isolados é o dos flavonoides, encontrando-se também aldeídos aromáticos,

ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas, aminoácidos, entre outros (Kumazawa et al., 2004; Vargas et al., 2004; Valente, 2011).

Utilizada pelas abelhas contra a proliferação de microrganismos (Bankova et al., 2005), a própolis apresenta várias outras propriedades bioativas, como a ação antiviral (Fischer et al., 2005), antiinflamatória (Ansorge et al., 2003), antioxidante (Kumazawa et al., 2004), antiparasitária (Dantas et al., 2006), anticariogênica (Duarte et al., 2003), anticarcinogênica (Ishikawa et al., 2004), fitotóxica (Johnson et al., 1994) e imunomoduladora (Orsi et al., 2000; Fischer et al., 2007).

A função imunomoduladora da própolis foi evidenciada por diversos autores, como Fischer et al. (2006), que adicionaram a própolis à vacinas inativadas de herpesvírus bovino tipo 5 BoHV-5 visando avaliar seu efeito adjuvante. Os autores observaram que os bovinos que receberam vacina com própolis apresentaram níveis significativamente mais elevados de anticorpos em relação ao grupo controle sem própolis. Estes dados são semelhantes ao encontrado posteriormente por Fischer et al. (2007), em outro estudo que visou verificar a capacidade adjuvante de um extrato etanólico de própolis. Para isso, os autores adicionaram o extrato em vacina inativada de herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) e a inocularam em camundongos. Observaram incremento na resposta imune celular nos camundongos que receberam a vacina com a própolis e, posteriormente, verificaram incremento na resposta imune celular e humoral nos camundongos que receberam vacinas contendo extrato etanólico associado ao antígeno (SuHV-1) e hidróxido de alumínio.

Outros efeitos benéficos promovidos pela própolis, ao sistema imune de camundongos foram relatados em pesquisas, como o aumento na permeabilidade das membranas mitocondriais (Galati et al., 2000), aumento na atividade dos linfócitos Natural Killer (Sforzin et al., 2002), atividade imunossupressora (Sá-Nunes et al., 2003), aumento no número total de linfócitos T auxiliares (Park et al., 2004), dentre outros (Ivanovska et al., 1995; Sy et al., 2006)

Entretanto, são poucos os estudos que investigam a ação da própolis no sistema imune das abelhas *A. mellifera*, sendo dificilmente encontrados trabalhos que utilizem este produto no campo ou em laboratório. Recentemente um trabalho a campo realizado por Simone et al (2009) teve como objetivos, verificar o efeito da própolis nas cargas

bacterianas presentes na colônia e na imunidade das abelhas. Para isso, os pesquisadores pintaram os núcleos internamente com extrato alcóolico de própolis, assim como alguns quadros vazios para posteriormente alojarem as abelhas. Para análise da imunidade e expressão gênica, foram colhidas larvas e abelhas de diferentes idades. Por fim, os autores observaram que os núcleos que receberam o tratamento com a própolis apresentaram menor carga bacteriana e as abelhas apresentaram menor expressão de dois genes divergentes relacionados à imunidade. Segundo os pesquisadores, os dados indicam que abelhas que vivem em colônias com grande concentração de própolis são capazes de gastar menos energia nas funções imunológicas, possivelmente, devido à redução da carga bacteriana presente e, além disso, sugeriram que a regulação menor dos dois genes é a primeira evidência clara de que a utilização da própolis pode ter implicações na saúde e produtividade da colônia.

Já Niu et al. (2010) realizaram um experimento em laboratório que visou estudar a toxicidade das micotoxinas nas abelhas (*A. mellifera*) e a sua melhora ocasionada pela própolis. Para isso, os autores forneceram, por meio de alimentação artificial, aflatoxina1 e aflatoxina1 com adição de própolis em diferentes concentrações. Por fim observaram que as abelhas que receberam o tratamento contendo própolis apresentaram tempo de vida maior comparado aos tratamentos infectados com aflatoxina1, sugerindo assim, que a própolis pode ter a função adjuvante para desintoxicação.

Apesar dos efeitos da própolis terem sido evidenciados em outros animais, são escassos os trabalhos que investiguem a atuação da própolis quando consumida por abelhas *A. mellifera*. Desse modo, se faz necessário investigar os possíveis efeitos deste produto apícola no sistema imunológico destes polinizadores.

O Capítulo 2, denominado “**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DA PRÓPOLIS NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNOLOGICO DE ABELHAS *Apis mellifera* L. SUMETIDAS AO DESAFIO BACTERIANO**”, apresenta-se de acordo com as normas de publicação da revista *Apidologie*, exceto pelo idioma e posicionamento das tabelas. O objetivo do trabalho foi analisar a influência do fornecimento da própolis nas expressões dos genes relacionados à imunidade de abelhas *Apis mellifera* L., submetidas a desafio bacteriano.

O Capítulo 3, denominado “**EFEITO DO CONSUMO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PRÓPOLIS NO COMPORTAMENTO E MORTALIDADE DAS ABELHAS *Apis mellifera* L. SUBMETIDAS ÀS VARIADAS DOSES DE FIPRONIL**”, apresenta-se de acordo com as normas de publicação da revista *Apidologie*, exceto pelo idioma e posicionamento das tabelas. O objetivo do trabalho foi verificar se o consumo do extrato de própolis pode influenciar o comportamento e a mortalidade das abelhas *Apis mellifera* L. submetidas a diferentes concentrações de fipronil.

Referências bibliográficas

ADELMANN, J. et al. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.43, p.174-178, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico F43: fipronil**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 20 mai. 2014.

AGUILAR, R. et al. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. **Ecology Letters**, v.9, p.968–980, 2006.

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

ALBRECHT, M.; SCHMID, B.; HAUTIER, Y.; MÜLLER, C.B. Diverse pollinator communities enhance plant reproductive success. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.279, p.4845–4852, 2012.

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

AMARAL, L. M. R. **Sistema immune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009.78f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)-Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tubingen, v.58, p.580-589, 2003.

ASHAMN, T.L. et al. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. **Ecology**, v.85, p.2408–242, 2004.

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

BANKOVA, B. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v.2, p.29-32, 2005.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v.57, p.530-533, 2002.

BARBOSA, M.H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v.22, p.318-322, 2009.

BASF, the Chemical Company (2014). Inseticidas. Regent® 800WG [online] <<http://www.agro.basf.com.br>> Acessado em: 15 mai 2014.

BELIEN, T. et al. Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.74, n.1, p.245-253, 2009.

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

BONCRISTIANI, H. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels of honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, New York, v. 58, p. 613-620, 2012.

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

BREEZE, T.D.; et al. Pollination services in the UK: How important are the honeybees? **Agriculture, Ecosystems and Enviroment**, v.142, p.137-143, 2011.

BRITAIN, C.; WILLIAMS, N.; KREMEN, C.; KLEIN, A.M. Synergistic effects of non-*Apis* bees and honey bees for pollination services. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.280, 2012.2767, 2013.

BUCHMANN, S.; NABHAN, G. **The forgotten pollinators**, Island Press, 1996.
BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food & Chemical Toxicology**, Kansas, v. 36, p. 347-363, 1998.

BUTLER, C.G. **The honey bee colony-life history**. In “The Hive and the Honey Bee”, pp. 39-74, Dadant and Sons, Hamilton, 1975.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B.N. Bees diversified in the age of eudicots. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.280 (1755), p.1-9, 2013.

CARPENTER, F.M. Fossil Insects. **Insect**, p. 14-19, Washington, D.C. 1952.

CARPENTER, F.M.; HERMANN. Antiquity of sociality in insects. **Insect**, Academic-Press, v.1, p.81-89, New York, 1979.

CASTEELS, P. et al. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. **The EMBO Journal**, New York, v.8, n.8, p.2387-2391, 1989.

CASTEELS, P. et al. Funcional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial Polypeptide that is infection inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 10, p. 7044-7054, 1993.

CASTEELS, P. et al. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry**, v.187, p.381-386, 1990.

CASTEELS-JOSSON, K. et al. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v.269, p.28569-28575, 1994.

CESI, F. **Descrizione dell'api** (broadsheet dedicated to Pope Urban VII) 1625.

CHIARI, W.C. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n.3, p.587-395, 2004.

CHIARI, W.C. et al. Pollination of soybean (*Glycine max* L. Merrill) by honeybees (*Apis mellifera* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p.31-36, 2005.

CONSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v.387, 1997.

COTTICA, S.M. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.22, n.5, p.929-935, 2011.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002, 191p.

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

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

CREMONEZ, T.M. **Influência da nutrição sobre aspectos da fisiologia e nutrição de abelhas *Apis mellifera***. 2001. 87f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

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

CUETO, A.P. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, p.1800-1806, 2011.

DANFORTH, B. N. et al. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 103, p. 15118-15123, 2006.

DANTAS, A.P. et al. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.103, p.187-193, 2006.

DEODIKAR, G.B.; THAKAR, C.V.; SHAW, P.N. Cytogenetic studies in Indian honey bees. 1. Somatic chromosome complement in *Apis indica* and its bearing on evolution and phylogeny. **Proceedings of Indian Academy of Sciences**, v.49, p.194-206, 1959.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sub lethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.81-106, 2007.

DIAS, L.G.; PEREIRA, A.P.; ESTEVINHO, L.M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, Kansas, v.50, p.4246-4253, 2012.

DUARTE, S. et al.. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p. 527-531, 2003.

ELLIS, M.D. Pesticides and bee toxicity. **American Bee Journal**, v.150, p.485-486, 2010.

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

EVANS, J.; WHEELER, D.E. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v.15, n.5, p.597–602, 2000.

EVANS, J.D. et al. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, Oxford. In press, 2006.

EVANS, J.D. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, n.2, p.105-111, 2004.

EVANS, J.D.; LOPES, D.L. Bacterial Probiotics Induce an Immune Response in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n.3., p.64-71, 2004.

EVANS, J.D.; PETTIS, J.S. Colony-level impacts of immune responsiveness in honeybees, *Apis mellifera*. **Evolution**, Oxford, v.59, p.2270-2274, 2005.

FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS Disponível em: < <http://faostat.gao.org>> Acesso em> 15 Jan 2015.

FISCHER, G. et al. Avaliação da capacidade coadjuvante de um extrato alcoólico de própolis verde em bovinos vacinados contra o Herpesvírus Bovino tipo 5. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 2006, Aracaju. **Anais...**Aracaju, 2006.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green própolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, Maryland Heights, v.25, p.1250-1256, 2007.

FISCHER, G.; et al. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7., 2005, Pelotas. **Anais...**Pelotas, 2005.
FRASER, H.M. **History of Beekeeping in Britain**. Foxton, UK: Apis Club.1958.

FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. A importância da polinização. **Mensagem doce**, v. 80, p. 44-46, 2005.

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

FREITAS, B.M.; PINHEIRO, J.N. **Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: MMA, 2012.112p.

GALATI, G. et al. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, Berlin, v.17, p.311-349, 2000.

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

GARIBALDI et al. Wild Pollinator Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. **Science**, v. 339 (6127), p.1608-1611, 2013.

GELS, J.A.; HELD, D.W.; POTTER, D.A. Hazards of insecticides to the bumble bees *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) foraging on flowering white clover in turf. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 722-728, 2002.

GHAZOUL, J. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. **Trends in Ecology and Evolution**, v.20, p.365-373, 2005.

GHISI, N.C. et al. Evaluation of Genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.180, n.1., p.589-599, 2011.

GIANNINI, T.C.; CORDEIRO, G.D.; FREITAS, B.M.; SARAIVA, A.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. The dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v, 108 (3), p.849-857, 2015.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, p. 503-512, 2002.

GONÇALVES, L.S. Expansão da apicultura brasileira e suas perspectivas em relação ao mercado apícola internacional. **Anais..Anais do XV Congresso Brasileiro de Apicultura- Natal- RN**, 2004.

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

GREGORC, A.; ELLIS, J. Cell death in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.200-207, 2011.

HOEHN, P.; TSCHARNTKE, T.; TYLIANAKIS, J.M.; STEFFAN-DEWENTER, I. Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.275, p. 2283–2291, 2008.

HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature**, New York, v. 443, p. 931-949, 2006.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: 15 Jan 2015.

ISHIKAWA, M. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. **Journal of Pharmacological Sciences**, Kyoto, v.94, p.129-129, 2004.

IVANOVSKA, N.D, et al. . Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.47, p.135-143, 1995.

JANSCHA, A. **Abhandlung von Schwarmen der Bienen** (Vienna: Joseph Kurzbock). 1771.

JIANG, H. The biochemical basis of antimicrobial reponses in *Manduca sexta*. **Insect Science**, Weinheim, v.15, p.53-66, 2008.

JOHANSSON, K.C.; METZENDORF, C.; SODERHALL, K. Microarray analysis of immune challenged *Drosophila hemocytes*. **Experimental Cell Research**, New York, v.305, p.145-155, 2005.

JOHNSON, K.S.; EISCHEN, F.A.; GIANNASI, D.E. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (*Lepidoptera, Pyralidae*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.20, n.7, p.1783-1791, 1994.

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

KALOGEROPOULOS, N. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, Kansas, v.116, p.452-461, 2009.

KEVAN, P.G.; PHILLIPS, T.P. The economic impacts of pollinator declines: na approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, v. 5, p.8, 2001.

KLAUDINY, J. et al. Two structurally different defending genes, one of them encoding a novel defending isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p.11-22, 2005.

KLEIN A.M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE T. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.270, p.955–961, 2003.

KLEIN, A.M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.274, p.303–313, 2007.

KOENIGER, N. Neue Aspekte der Phylogenie innerhalb der Gattung *Apis*. **Apidologie**, v.7, p.357-366, 1976.

KUCHARSKI, R.; MALESKA, R. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**, Madison, v.3, 2003.

KULDNA, P. et al. An application of DPSIR framework to identify issues of pollinator loss. **Ecological Economics**, v.69, p.32-42, 2009

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Kansas, v.84, p.329, 2004.

LINDAUER, M. Communication among the honeybees and stingless bees of India. **Bee World**.v.38, p.3-14, 1975.

LIRA, A.F. **Estudo da cinética de inibição anticolinesterásica por dialquilfosramidatos**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

LOBO, N.F. et al. Genomic analysis in the sting-2 quantitative trait locus for defensive behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. **Genome Research**, New York, v.13, p.2588-2593, 2003.

LOURENÇO, A.P. et al. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. **Insect Biochemical Molecular Biology**, Riverside, v.35, p.541-552, 2005.

LOURENÇO, A.P. **Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera***. 2007.172f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

LUO, T. et al. A novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.551, p. 53-57, 2003.

LUSTOSA, S.R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, p.447-454, 2008.

MAA, T.C. An inquiry into the systematics of the Tribus Apidini or honeybbes (Hymenoptera). **Treubia**, v.21, p.525-640, 1953.

MALERBO-SOUZA, D.T.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.237-242, 2003.

MELLO, M.H.S.H.; SILVA, E.A.; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v.37, p.237-241, 2003.

MENDONÇA, L.S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) apresentada na Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

MONTENEGRO, G.; PENA, R.; TIMMERMANN, B.N. Botanical resources for propolis in an apiary network in Central Chile. *Phyton*. **International Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.69, p.191-201, 2001.

NIU, G.; JOHNSON, R.M.; BERENBAUM, M.R. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. **Apidologie**, Paris, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010039>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

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

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 6, p. 205-219, 2000.

PARK, Y.K, et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Yuba, v.52, p.1100-1103, 2004.

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

- PERES, F. MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F (Org). **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. 384p.
- PETTIS, J. et al. Effect of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.35, n.6, p.605-610, 2004.
- PETTIS, J.S. et al. Croppollination exposes honey bees to pesticides which alter their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranea*, **PloS One**, v.8, n.7, p. e70182, 2013.
- POTTS, S.G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, p.345-353, 2010.
- RATNIEKS, F.L.W.; CARRECK, N.L. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v. 327, n.5962, p.152-153, 2010.
- REMNANT, R. A Discourse of Historie of Bees (London: Printed by R. Young for T. Slater, 1637). Available in the microfilm edition, **Early English Books**, v.934, n.20879, p.1475-1640. 1967.
- RIBBANDS, R. The Behavior and Social Life of Honey Bee. **Bee Res. Association, Ltd.**, London. 352pp.1953.
- RICHARDS, A.J. Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? **Ann.Biol.**, v.88, p. 165-172, 2001.
- RICKETTS, T.H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, Chichester v.11, p.499-515, 2008.
- RIGHI, A.A. **Perfil Químico de Amostras de Própolis Brasileiras**. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) apresentada no Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ROBINSON G. E.; Grozinger C. M.; Whitfield C. W. Sociogenomics: social life in molecular terms. **Nature Reviews Genetics**, New York, v.6, p.257-270, 2005.
- SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H; SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.87, p.93-97, 2003.
- SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v.8, n.1, p.19-29, 2002.

SHIRES, W. et al. The effects of a new pyrethroid insecticide WL-85871 on foraging honey bees (*Apis mellifera* L.) **Pesticide Science**, v.15, p.491-499, 2006.

SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, p.84-89, 2008.

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

SMITH, R.K. **Identification of Africanization in honey bees based on extracted hydrocarbon**. In. "Africanization in Honey Bees and Bee Mites". New York.,1988. p.275-28.

SOUZA, T.F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009.49f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SPADOTTO, C.A. Abordagem Interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, 2006. Disponível em: < <http://www.fmr.edu.br/ní/003;pdf>>, Acesso em: 07 mai. 2015.

SY, L.B. et al. Propolis extracts exhibit immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. **International Immunopharmacology**, Oklahoma, v.6, p.1053-1060, 2006.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v.292, p. 281-284, 2001.

TRAPP, S.; PUSSEMIER, L. Model calculations and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. **Chemosphere**, v. 22, n.3.0

TZOU, P.; DE GREGORIO, E.; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactopn. **Current Opinion in Microbiology**, Philadelphia, v.5, n.1, p.102-110, 2002.

VALENTE, M.J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, Kansas, v.49, p.86-92, 2011.

VAN ENGELSDORP, D. et al. A survey of honey bee colony losses in the US, Fall 2008 to Spring 2009. **Journal of Apicultural Research**, v.49, p.7-14, 2010.DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.03

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

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.159-163, 2004.

WAGNER, T.C.; RAUF, A.; SCHWARZE, S. Pesticides and tropical biodiversity. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.4, p.178-179, 2010.
WARE, G.W. **The Pesticide Book**. 5 ed. Fresno: Thomson Publications, 2000. 69p.

WIESE, H. **Apicultura: Novos tempos**. 2ª. Ed. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

WU, J.L. et al. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white sopt syndrome virus. **Fish&Shellfish Immunology**, Foster, v.13, 391-403, 2002.

YANG, X.; COX-FOSTER, D. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence an microbial challenge. **Parasitology**, Cambrigde, v.134, p.405-412, 2007.

ZANDER, E; WEISS. **Das Leben der Biene**. Ulmer, Stuttgart, 189pp.1964.

ZHANG, Y. et al. Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A.cerana* induced by *Varroa destructor* infection. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.1207-1218.

CAPÍTULO II

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DA PRÓPOLIS NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE ABELHAS *Apis mellifera*
L. SUMETIDAS AO DESAFIO BACTERIANO**

RESUMO: As abelhas *Apis mellifera* podem estar sujeitas a uma série de ameaças como parasitas e patógenos que acometem seu sistema imunológico. Tal fato torna necessária a busca por produtos naturais que possam contribuir com a melhora do sistema imune destes insetos, como a própolis. Diante do exposto, o objetivo foi analisar a influência do fornecimento da própolis em expressões de genes relacionados à imunidade de abelhas *Apis mellifera* L. submetidas ao desafio bacteriano. Ao longo de 30 dias, quatro colmeias receberam semanalmente os tratamentos com diferentes porcentagens de extrato alcoólico de própolis 30% (0%, 5%, 10%, 15%). O experimento foi casualizado em esquema fatorial 4 x 2 x 2 x 3 (tratamentos x com ou sem bactéria x tempos x períodos), totalizando 48 amostras. Foram observadas as expressões dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*. Como controle interno foi utilizado o gene actina. Os resultados foram comparados por ANOVA seguidos do teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram observadas alterações na expressão gênica das abelhas estudadas para todos os períodos e tratamentos, antes e após desafio bacteriano, para todos os genes propostos, sendo ainda verificada induções da expressão relativa nos três períodos. Conclui-se que nas condições do presente trabalho, a própolis pode induzir a expressão relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*, quando submetidas a desafio bacteriano. Entretanto, não se pôde caracterizar um tratamento com própolis que apresente uma maior expressão relativa para todos os genes simultaneamente.

Palavras chave: abelhas melíferas/ expressão gênica/ imunidade / transcrição gênica/ PCR tempo real.

**INFLUENCE OF PROPOLIS CONSUMPTION IN GENES EXPRESSION
RELATED TO IMMUNE SYSTEM OF *Apis mellifera* L. BEES SUBJECTED TO
CHALLENGE BACTERIA**

ABSTRACT: The *Apis mellifera* bees may be subject to a number of threats as parasites and pathogens that affect your immune system. This fact makes it necessary to look for natural products that can contribute to improving the immune system of these insects such as propolis. Given the above, the objective was to analyze the influence of the supply of propolis in gene expressions related to immunity of *Apis mellifera* L. bees subjected to bacterial challenge Over 30 days, four hives receive weekly treatments with different percentages of alcoholic extract of propolis 30% (0%, 5%, 10%, 15%). The experiment was randomized in a factorial 4 x 2 x 2x 3 (treatments x with or without bacteria x times x periods), totaling 48 samples. It was observed the expressions of abaecin, hymenoptaecin, apidaecin and defensin1 genes. As internal control was used actin gene. The results were compared by ANOVA followed by Tukey test (P <0.05). Alterations were observed in gene expression of bees studied for all periods and treatments before and after bacterial challenge for all proposed genes, were yet verified inductions of relative expression in the three periods. It is concluded that under the conditions of this study, propolis can induce the relative expression of genes abaecin, hymenoptaecin, apidaecin and defensin1, when subjected to bacterial challenge. However, it is not able to characterize a treatment with propolis presenting greater relative expression for all genes simultaneously.

Key-words: genic expression / gene transcription / honey bees / immunity / real time PCR

1. Introdução

A redução da população de polinizadores silvestres e do número de colmeias de abelhas melíferas tem sido motivo de preocupação mundial (Pott et al., 2010; VanEngelsdorp et al., 2010). Presume-se que o declínio das abelhas *Apis mellifera* estaria relacionado à interação de diversos fatores, tais como doenças, o aumento na infestação de parasitas como o *Varroa destructor*, a má nutrição, o uso abusivo de agrotóxicos, dentre outros que podem prejudicar seu sistema imunológico (Freitas et al., 2009; Freitas; Pinheiro, 2010)

O sistema imune dos insetos, ao contrário dos vertebrados, não apresenta um verdadeiro sistema imune adaptativo, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas (*Ig-like protein*) tenham sido encontradas (Wu et al., 2002; Roffl; Reynolds, 2009). A resistência a doenças nos invertebrados baseia-se no sistema inato de defesa, o qual inclui a síntese de peptídeos antimicrobianos, de proteinases inibidoras e de moléculas de adesão celular, ou seja, uma série de reações celulares e humorais coordenadas (Jiang, 2008; Mao et al., 2011).

Um método de verificar a imunidade dos insetos que tem sido utilizado é a genética molecular. O projeto que realizou o genoma das abelhas (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) e outras recentes pesquisas (Simola et al., 2013; Cameron et al., 2013; Holt et al., 2013), forneceram um número significativo de novas fontes de possíveis genes que podem contribuir no entendimento da genética das abelhas. Dentre diversos estudos que avaliaram a expressão de genes relacionados à imunidade em abelhas *Apis mellifera*, os principais genes encontrados são o dos peptídeos antimicrobianos, abaecina, apidaecina, defensina, hymenoptaecina (Casteels-Josson et al., 1994; Evans; Pettis, 2005; Evans, 2006).

Segundo Miyagi et al., (2000) o aumento da indução gênica destes peptídeos poderia contribuir na melhora da resposta imunológica das abelhas. Sendo assim, a procura por alternativas que possam promover a indução destes genes nos insetos, com o intuito de fortalecer seu sistema imunológico, se faz necessária. Uma delas poderia ser o uso da própolis, devido às suas diversas propriedades biológicas, como a ação antiviral (Souza et al., 2013), antiinflamatória (Ansorge et al., 2003; Silva et al., 2013),

antioxidante (Kumazawa et al., 2004; Frozza et al., 2013), e imunomoduladora (Orsatti et al., 2010; Sforcin; Bankova, 2011).

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou através da supressão de elementos do sistema imunológico, no caso da própolis sua ação já foi descrita tanto como estimulante quanto como inibidora de eventos imunológicos, sendo atribuída como possível justificativa a sua composição química (Kirkley, 1999; Fischer et al., 2007).

A função imunomoduladora da própolis em animais foi evidenciada quando estudada em camundongos, bovinos e suínos, apresentando elevação na resposta imune celular e humoral, atividade imunossupressora, aumento no número total de linfócitos T auxiliares, dentre outros (Park et al., 2004; Sy et al., 2006; Fischer et al., 2007; Sforcin; Bankova, 2011). No entanto, em *A. mellifera*, a influência da própolis no sistema imunológico foi pouco estudada, sendo verificada sua função adjuvante na desintoxicação de abelhas submetidas à micotoxinas, impacto de sua administração no controle da cria pútrida americana, implicações na carga bacteriana de colmeias e produtividade da colônia (Antunez et al., 2008; Simone et al., 2009; Niu et al., 2010).

Além disso, a própolis tem sido utilizada empiricamente pelos apicultores para o controle de outras doenças (Antunez et al., 2008), portanto, torna-se fundamental investigar e fomentar novos dados que contribuam com a explanação dos possíveis efeitos da própolis no sistema imunológico dessas abelhas.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a influência do fornecimento do extrato alcoólico de própolis nas expressões dos genes relacionados à imunidade de abelhas *Apis mellifera L.*, submetidas a desafio bacteriano.

2. Material e métodos

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no apiário do Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, localizado na Fazenda Experimental Lageado da UNESP, *campus* de Botucatu, 22^o49'S e 48^o24'O com clima *Cfa* e altitude média de 623 metros.

2.2. Produção e extração da própolis

Para a produção de própolis foram utilizadas cinco colmeias. A própolis utilizada na pesquisa foi obtida no próprio apiário do setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu.

Para a produção, fez-se o uso de coletores do tipo “tela plástica” que era colocada sob a tampa da colmeia. A produção da própolis ocorreu ao longo de três meses e a colheita foi feita mensalmente. A tela com própolis foi retirada da colmeia, acondicionada e mantida em freezer a -20°C. A extração da própolis da tela foi realizada por meio de fricção (Lima, 2006).

2.3. Colmeias utilizadas

Ao todo foram utilizadas quatro colmeias divididas por tratamento contendo diferentes porcentagens de extrato alcoólico de própolis 30%. As abelhas *Apis mellifera* africanizadas foram alojadas em colmeias padrão modelo Langstroth, contendo dez quadros, pintadas externamente com tinta óleo de coloração verde claro, mantidas sobre cavaletes de 50 cm de altura e numeradas para facilitar a identificação. As colônias selecionadas foram manejadas antes do início dos experimentos para padronizar a população de abelhas e quadros de crias.

2.4. Tratamentos

Para o preparo dos extratos alcoólicos de própolis (EAP), toda a própolis produzida foi misturada e mantida em freezer -20°C. Depois de congelada, a própolis foi triturada e os EAP foram preparados na proporção de 30% (sendo adicionados 30 gramas de própolis e completado seu volume com álcool etílico 70%). As soluções permaneceram ao abrigo da luz, sob agitação frequente, durante sete dias. Decorrido este período, as soluções foram filtradas e os EAP obtidos (Souza et al., 2010; Heinzen et al., 2012).

O EAP obtido foi utilizado para os seguintes tratamentos: Tratamento controle (xarope de mel e água destilada na proporção 1:1), Tratamento 5% (50 ml de EAP em

950 ml de xarope), Tratamento 10% (100 ml de EAP em 900 ml de xarope) e Tratamento 15% (150 ml de EAP em 850 ml de xarope).

A distribuição dos tratamentos foi realizada ao acaso, sendo fornecidos semanalmente 250 ml, em alimentadores tipo *Boardman* ao longo de 30 dias.

2.5. Coleta das abelhas

No dia anterior à primeira coleta, foram retirados, por colmeia, dois quadros de cria operculada (em estágio de pupas) com o mesmo padrão de escurecimento dos opérculos. Em seguida, estes quadros foram envolvidos em tecido Tule e alojados em incubadora de ventilação forçada. No dia seguinte, para que as idades ficassem padronizadas, as abelhas adultas recém-emergidas foram marcadas com caneta hidrocor atóxica, na região dorsal do tórax (pronoto) e por fim, devolvidas para suas respectivas colmeias.

O primeiro dia de coleta das abelhas ocorreu antes do fornecimento dos tratamentos e as duas coletas seguintes ocorreram, respectivamente, 15 e 30 dias após.

Para cada um dos dias de coleta, 120 abelhas operárias previamente marcadas foram retiradas de cada colmeia tratamento e anestesiadas por resfriamento em freezer a -10°C por 1 a 2 minutos.

2.6. Bactéria

Para realizar o desafio nas abelhas foi utilizada cepa a da bactéria *Escherichia coli*, fornecida pelo Prof. Dr. Ary Fernandes Junior do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Para a preparação da solução bacteriana foi realizada a técnica de repicagem, que consistiu na transferência da bactéria do meio de cultura sólido para o meio de cultura líquido BHI (“Brain Hearth Infusion”). Após a semeadura, a bactéria foi armazenada em incubadora na temperatura entre 35 a 37° C, durante o período de 18 a 24 horas antes da sua utilização. Este procedimento foi repetido a cada dia anterior às análises de desafio bacteriano, respeitando o tempo de crescimento bacteriano.

A solução bacteriana foi ajustada de acordo com a escala de Mac Farland na concentração de 1×10^3 células/abelha (Evans et al., 2006).

2.7. Infecção

O experimento foi casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 x 2 x 3 (tratamentos x com ou sem bactéria x períodos de observação x dias), totalizando 48 amostras.

As abelhas coletadas de cada tratamento foram submetidas ao desafio bacteriano, que consistiu na inoculação da *E. coli* por meio de injeção (1µl) com seringa Hamilton, sendo aplicada entre o terceiro e o quarto tergitos dorsais (Yang; Cox-Foster, 2007). O controle consistiu em perfuração superficial com método idêntico de injeção, porém sem a inclusão da bactéria.

Para cada desafio (com e sem bactéria) foram considerados dois tempos para realizar as análises (0 e 6 horas). No tempo 0h, após a inoculação ou perfuração, as abelhas foram imediatamente colocadas no gelo para as avaliações da expressão gênica, enquanto as abelhas do tempo 6h foram alojadas em caixas plásticas (10x20x20cm), identificadas e separadas entre desafiadas com bactéria ou sem. Durante este tempo as abelhas tiveram água e alimento *ad libitum*. Ao final do período de 6h também foram conduzidas para as avaliações de expressão gênica.

2.8. Avaliações da expressão relativa dos genes relacionados à imunidade

As colheitas das abelhas para a expressão dos genes relacionados à imunidade foram realizadas após as infecções e injúrias. Depois da colheita, as abelhas foram imediatamente armazenadas em freezer – 80° C para extração de RNA, no Laboratório de Parasitologia, no Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

Para a extração de RNA, a cabeça de cada abelha operária foi separada do corpo com o auxílio de um bisturi descartável (Scharlaken et al., 2008). Cada amostra foi composta de um “pool” de cinco cabeças e a extração do RNA foi feita com TRIzol segundo protocolo do fabricante, utilizou-se para cada amostra 500 µl de TRIzol (GIBCO BRL) para romper as células e liberar seu conteúdo. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1%, e quantificados com o aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

Após o tratamento do RNA com DNase, uma solução de oligo dT 0,75 mM; oligos aleatórios 0,15 mM; dNTP 0,75 mM e 11 µl RNA tratado com DNase na etapa

anterior, foi preparada e incubada a 65°C por 5 minutos e depois colocada no gelo por 1 minuto. A esta preparação, foi adicionado o tampão 1x; DTT 0,005 M; RNase out 40 U e 100 U da enzima super script III. Essa preparação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima.

Foi monitorado a alteração na expressão de genes relacionados ao sistema imune, entre eles, *defensin*, *abaecin* (Evans et al., 2006) *hymenoptaecin* e *apidaecin* (Simone et al., 2009). Como controle interno para as reações de PCR quantitativo, foi utilizado o gene *actin* (Scharlaken et al., 2008).

As reações de PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizadas no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems) utilizando o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos, um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A determinação da expressão dos genes foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR), em triplicatas. Em cada reação foi feito um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água. As sequências e informações dos oligonucleotídeos que serão utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo da expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas submetidas a desafio bacteriano.

Gene	Sequencia dos Primers 5'-3'	Ta ^a	E ^b (%)
Actina	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	61	91,17
	AGAATTGACCCACCAATCCA		
Hymenoptaecina	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	61	96,51
	GCGTCTCCTGTCATTCCATT		
Defensina	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	61	87,06
	AATGGCACTTAACCGAAACG		
Apidaecina	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	61	100
	GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT		
Abaecina	CAGCATTTCGCATACGTACCA	61	100
	GACCAGGAAACGTTGGAAAC		

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

A eficiência dos oligonucleotídeos (E) foi calculada a partir de quatro diluições de amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, utilizando a fórmula $E=10(-1/\text{inclinação})$. A quantificação relativa dos genes \otimes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), na qual o CP (crossing point) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo, utilizando a seguinte fórmula:

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

2.9. Análise estatística

Os resultados foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar as diferenças entre as médias. Foi considerado como estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$ (Zar, 2010).

3. Resultados

Os resultados referentes à quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*, com a utilização do gene *actin* como endógeno, em função dos tratamentos (0, 5, 10 e 15%) para as abelhas com ou sem desafio bacteriano em dois tempos de observação (0 e 6 horas) para o dia 0 de coleta, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela2: Médias e desvio padrão da quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1* nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 0, em relação ao tratamento controle.

<i>abaecin</i>	SEM BACTERIA		COM BACTERIA	
	TEMPO 0H	TEMPO 6H	TEMPO 0H	TEMPO 6H
5%	0,226±0,326Ab	0,029±0,029Ab	0,052±0,031Ab	7,174±2,25Aa
10%	0,001±0,001Ab	0,046±0,04Ab	0,049±0,02Ab	0,317±0,11Ba
15%	0,003±0,003Ab	0,212±0,185Ab	0,154±0,117Ab	1,699±0,78Ba
<i>hymenoptaecin</i>				
5%	0,004±0,006Ab	0,001±0,001Ab	2,630±1,40Ab	159,530±27Aa
10%	0,001±0,0004Ab	0,086±0,09Ab	0,199±0,09Bb	18,781±13,300Ba
15%	0,001±0,001Ac	0,016±0,012Ac	0,831±0,261ABb	12,057±0,390Ba
<i>apidaecin</i>				
5%	0,004±0,003Ab	0,530±0,6Bb	0,009±0,006Ab	2,593±1,357Aa
10%	0,014±0,016Ab	8,032±9,82Aa	0,5133±0,554Ab	3,983±3,257Aa
15%	0,034±0,02Ab	10,826±1,336Aa	0,513±0,556Ab	8,303±4,9901Aa
<i>defensin1</i>				
5%	0,463±0,742Aa	0,170±0,10Aa	0,117±0,175Aa	0,113±0,080Ba
10%	0,532±0,795Ab	1,660±1,178Aab	0,491±0,6Ab	3,942±1,784Aa
15%	0,039±0,055Aa	0,076±0,009Aa	0,043±0,03Aa	0,193±0,239Ba

Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Quando realizada a comparação entre os tempos 0h e 6h antes e depois do desafio bacteriano em relação a cada tratamento, foi possível observar que os maiores valores de indução foram verificados no tempo 6h, com bactéria, em todos os tratamentos dos genes *abaecin* e *hymenoptaecin*. Enquanto para o gene *apidaecin* os maiores valores de indução ocorreram, tanto no tratamento 5% no tempo 6h com bactéria, quanto nos tratamentos 10% e 15% no tempo 6h com e sem bactéria. No gene *defensin1* observou-se maior valor de indução no tempo 6h com bactéria no tratamento 10%, porém não se diferenciou estatisticamente do tempo 6h sem bactéria.

Realizando a comparação entre os tratamentos em relação a cada tempo de observação, foi possível observar maior valor de indução para o gene *abaecin* no tratamento 5% no tempo 6h com bactéria, não sendo observadas diferenças estatísticas para os demais tratamentos, enquanto no gene *hymenoptaecin* verificou-se maior valor de indução no tratamento 5% no tempo 6h com bactéria e também se verificaram que no tratamento 5% se diferenciou estaticamente apenas do tratamento 10% as 0h com bactéria. No gene *apidaecin* foi verificado maiores valores de indução nos tratamentos

10% e 15% no tempo 6h sem bactéria, e no gene *defensin1* verificou-se o maior valor no tratamento 10% no tempo 6h com bactéria.

Os resultados referentes à quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*, com a utilização do gene *actin* como endógeno, em função dos tratamentos (0, 5, 10 e 15%) para as abelhas com ou sem desafio bacteriano em dois tempos de observação (0 e 6 horas) para o dia 15 de coleta, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela3: Médias desvio padrão da quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1* nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 15, em relação ao tratamento controle.

<i>abaecin</i>	SEM BACTERIA		COM BACTERIA	
	TEMPO 0H	TEMPO 6H	TEMPO 0H	TEMPO 6H
5%	0,772±0,556Bb	2,848±2,172Ab	0,049±0,57Ab	21,810±11,385Aa
10%	0,201±0,183Bb	0,668±0,649Ab	0,272±0,346Ab	46,926±19,494Aa
15%	39,530±16,632Aa	1,298±0,297Ab	1,060±1,107Ab	21,230±12,137Aa
<i>hymenoptaecin</i>				
5%	0,202±0,154ABb	65,175±21,841Aa	0,001±0,001Ab	32,456±13,929Aa
10%	0,023±0,03Bb	7,990±5,06Ba	0,003±0,003Ab	2,338±2,241Bab
15%	0,389±0,091Ac	54,222±30,795Aa	0,605±1,042ABc	8,645±5,751Bb
<i>apidaecin</i>				
5%	0,001±0,001Bb	0,504±0,131Ba	0,020±0,017Ab	0,002±0,015Bb
10%	0,087±0,039Bb	15,974±11,206Aa	0,161±0,151Ab	0,018±0,008Bb
15%	0,768±0,503Aa	0,300±0,085Ba	0,301±0,232Aa	1,156±0,999Aa
<i>defensin1</i>				
5%	0,246±0,028Bb	1,634±0,082Aa	2,185±0,632Ba	0,017±0,015Bb
10%	1,255±0,586Ab	1,798±1,1988Ab	12,301±3,119Aa	0,949±0,856Ab
15%	0,207±0,055Bc	0,902±0,183Bb	1,458±0,333Ba	0,079±0,035Bc

Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Quando realizada a comparação entre os tempos 0h e 6h antes e depois do desafio bacteriano em relação a cada tratamento, foi possível observar no gene *abaecin* que os maiores valores de indução ocorreram no tempo 6h com bactéria, nos tratamentos 5% e 10% e no tempo 0h sem bactéria e 6h com bactéria no tratamento 15%. No gene *hymenoptaecin* o maior valor de indução foi encontrado nos tempos 6h com e sem bactéria para o tratamento 5%, além disso, no tempo 6h sem bactéria se diferenciou do tempo 0h com e sem bactéria para o tratamento 10%, verifica-se também

que no tempo 6h sem bactéria apresentou maior valor de indução para o tratamento 15%. No gene *apidaecin* observou-se que no tempo 6h sem bactéria apresentou os maiores valores de indução para os tratamentos 5% e 10%. No gene *defensin1* observou-se maior indução no tempo 0h com bactéria e 6h sem bactéria no tratamento 5% e também observou se que no tempo 0h com bactéria maior indução nos tratamentos 10% e 15%.

Realizando a comparação entre os tratamentos em relação a cada tempo, foi possível observar maior indução para o gene *abaecin* no tratamento 15% no tempo 0h sem bactéria, enquanto no gene *hymenoptaecin* ocorreram maiores valores de indução no tratamento 15% nos tempos 0h, com e sem bactéria, para os tratamentos 5% e 15% no tempo 6h sem bactéria também apresentaram maiores induções assim como no tratamento 5% no tempo 6h com bactéria. No gene *apidaecin* foi verificado maiores valores de indução relativa no tratamento 15% nos tempos 0h sem bactéria e 6h com bactéria, no tratamento 10% apresentou maior indução relativa no tempo 6h sem bactéria. Para o gene *defensin1* verificou-se o maior valor de indução gênica nos tratamentos 5% e 10% no tempo 6h sem bactéria, além disso, o tratamento 10% apresentou maior valor de indução para os demais tempos com e sem bactéria.

Os resultados referentes à quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*, com a utilização do gene *actin* como endógeno, em função dos tratamentos (0, 5, 10 e 15%) para as abelhas com ou sem desafio bacteriano em dois tempos de observação (0 e 6 horas) para o dia 30 de coleta, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela4: Médias e desvio padrão da quantificação relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1* nos tempos 0 e 6h, com ou sem bactéria, em função dos diferentes tratamentos, no dia 30, em relação ao tratamento controle.

<i>abaecin</i>	SEM BACTERIA		COM BACTERIA	
	TEMPO 0H	TEMPO 6H	TEMPO 0H	TEMPO 6H
5%	2,876±1,085Ba	3,032±0,746Ba	3,478±1,268Aba	0,253±0,005Bb
10%	20,087±8,396Aa	1,244±0,2699Bb	0,309±0,088Bb	1,522±0,420Ab
15%	15,88±5,672Ab	52,223±1,08Aa	10,847±6,46Abc	0,892±0,693ABc
<i>hymenoptaecin</i>				
5%	0,172±0,186Bb	0,981±0,742Aab	0,168±0,142Bb	3,600±1,929Aa
10%	6,679±4,390Aa	0,741±0,731Ab	0,061±0,09Bb	0,221±0,110Bb
15%	4,746±2,772Aa	0,137±0,036Ab	0,794±0,633Ab	0,303±0,220Bb
<i>apidaecin</i>				
5%	0,025±0,012Cb	0,015±0,015Bb	0,340±0,017Ba	0,153±0,133Bab
10%	12,525±7,992Ba	1,309±1,504Bb	0,567±0,365Bb	0,935±0,602Bb
15%	490,650±168,750Aa	429,58±244,830Aa	68,038±0,232Ab	484,130±108,000Aa
<i>defensin1</i>				
5%	10,946±7,454Ab	0,636±0,260Bc	27,300±9,680Aa	0,039±0,001Bc
10%	5,154±6,484Ab	24,10±7,058Aab	40,967±17,432Aa	1,147±0,106Bb
15%	1,109±0,252Bb	0,578±0,116Bb	2,830±0,496Bb	7,537±1,677Aa

Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa entre médias (P<0,05).

Quando realizada a comparação entre os tempos 0h e 6h antes e depois do desafio bacteriano em relação a cada tratamento, foi possível observar no gene *abaecin* maior indução nos tempos 0h com bactéria e 6h sem bactéria no tratamento 5%, no tempo 0h sem bactéria para o tratamento 10% e no tempo 6h sem bactéria no tratamento 15%. Para gene *hymenoptaecin* o maior valor de indução verificado foi no tempo 6h com bactéria para o tratamento 5%, além disso, no tempo 0h sem bactéria apresentou maior valor de indução para os tratamentos 10% e 15%. No gene *apidaecin* observou-se que no tempo 0h com bactéria apresentou os maiores valores de indução para os tratamentos 5%, também no tempo 0h, porém sem bactéria o maior valor foi encontrado no tratamento 10% e nos tempos 0h sem bactéria e 6h com e sem bactéria verificou-se maior valor para o tratamento 15%. No gene *defensin* observou-se maior indução relativa no tempo 0h com bactéria no tratamento 5% e 10% e também se observou no tempo 6h com bactéria maior indução no tratamento 15%.

Realizando a comparação entre os tratamentos em relação a cada tempo foi possível observar que no gene *abaecin* o tratamento 15% apresentou os maiores valores de expressão relativa para os tempos 0h sem bactéria, juntamente com o tratamento 10%; no tempo 6h sem bactéria e no tempo 0h com bactéria, sem apresentar diferença estatística com o tratamento 5%, além disso, no tempo 6h com bactéria foi observado maior valor de expressão relativa para o tratamento 10%, não se diferenciando do tratamento 15%. No gene *hymenoptaecin* foram verificados maiores valores de indução no tratamento 15% nos tempos 0h, com e sem bactéria, sendo o último juntamente com o tratamento 10%. O tratamento 5% apresentou o maior valor de indução no tempo 6h com bactéria. No gene *apidaecin* foi verificado que os maiores valores de expressão relativa foram observados tratamento 15% em todos os tempos. Para o gene *defensin1* verificou-se o maior valor de indução nos tratamentos 5% e 10% nos tempos 0h, com e sem bactéria, além disso, o tratamento 10% apresentou maior valor de indução no tempo 6h sem bactéria e o tratamento 15% no tempo 6h com bactéria.

4. Discussão

Como o tratamento 0% foi utilizado como controle para o cálculo dos dados, estes valores de indução da expressão observados nos tratamentos contendo própolis (5, 10 e 15%) sugerem que a própolis pode ter contribuído na indução dos genes estudados, quando as abelhas foram desafiadas com e sem bactéria, uma vez que foram encontrados valores de indução da expressão superiores ao valor 1 da expressão do endógeno. As induções observadas são semelhantes às encontradas por Siede et al. (2012) que verificaram aumento na expressão para os genes *hymenoptaecin*, *abaecin* e *apidaecin* (médias de 112; 20 e 20,7 vezes, respectivamente) em abelhas submetidas a desafio com *Paenibacillus larvae* por meio de injeção. Os genes codificadores dos peptídeos (abaecina, hymenoptaecina, apidaecina e defensina) também foram ativados em abelhas adultas por bactéria *Escherichia coli* (Gram-negativa) em outros trabalhos (Casteels et al., 1989; Casteels-Josson et al., 1994; Evans et al., 2006). Considerando que as abelhas adultas infectadas são capazes de gerar resposta imune contra microrganismos por meio do aumento da transcrição dos genes codificadores de peptídeos (Sied et al., 2012) e que esse aumento esteja relacionado como melhora do

sistema imune das abelhas (Miyagi et al., 2000), é possível sugerir, a partir dos dados observados, que a própolis poderia promover melhora no sistema imune destes insetos.

Apesar dos valores de indução observada nos genes, foi verificado também que durante o período experimental os dados apresentaram oscilações nos valores de expressão, demonstrando alterações de repressão e indução dentro de um mesmo dia ou tempo de observação.

As oscilações de expressão relativa observadas poderiam ser justificadas pelas vias de sinalização intracelular responsáveis pela regulação dos genes codificadores de peptídeos, sendo estas a Toll, Imd, JNK e JAK/STAT. (Tzou et al., 2002; Evans et al., 2006). Segundo Lemaitre e seus colaboradores (1997), essas vias podem ser acionadas independentemente além de poderem atuar normalmente de forma sinérgica. Além disso, a ativação dos genes e a produção dos peptídeos são disparadas não apenas pela injeção do patógeno, como também por estímulo mecânico, o que evidencia que as abelhas não apresentam uma resposta específica para determinado fator estressor (Siede et al., 2012). Considerando tais observações, é possível sugerir que no momento em que foram realizadas as coletas das abelhas para análise da expressão gênica, o caminho utilizado para a resposta imune não tenha sido o mesmo para as abelhas analisadas.

Outra possível explicação para as oscilações são as características particulares dos peptídeos antimicrobianos. Dentre os peptídeos estudados, a Abaecina é mais ativa contra bactérias Gram-negativas, apesar de também atuar em Gram-positivas, enquanto a Apidaecina é mais efetiva contra Gram-negativa e possui ação mais intensa contra bactérias do que outros patógenos. A hymenoptaecina também age contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas é mais encontrada nas larvas (Casteels et al. 1990; 1993). A defensina, apesar de ser um peptídeo antimicrobiano, esta relacionada ao estresse das abelhas e possui papel importante no combate de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e outros patógenos (Klaudiny et al. 2005). Ao considerar tais características é possível sugerir que as respostas observadas tenham variado devido as possíveis funções desempenhadas no sistema imune das abelhas.

Outra possibilidade de explicação para as oscilações observadas é o efeito da própolis. O presente estudo sugere que a própolis possa induzir a expressão relativa dos genes estudados; porém, Simone et al. (2009) verificaram que o efeito da própolis nas

cargas bacterianas presentes na colônia e imunidade das abelhas, apresentou menor expressão do gene *hymenoptaecin*, sugerindo que abelhas que vivem em colônias com grande concentração de própolis, são capazes de gastar menos energia nas funções imunológicas, devido à redução da carga bacteriana presente. Sendo assim, seria possível presumir que os casos observados de indução seguida de supressão gênica poderiam estar relacionados à resposta imediata suficiente para o controle da situação, sugerindo assim, que a influência da alimentação não estaria resultando em supressão da resposta, mas sim, baixa regulação. Além disso, segundo Fischer et al. (2007) a ação imunomoduladora da própolis ocorre de forma contraditória, pois já foi descrita como estimulante e inibidora de estímulos imunológicos.

Outra justificativa seria a variação da expressão relativa dos genes em relação à idade das abelhas analisadas, que foram marcadas e acompanhadas ao longo dos 30 dias. As operárias adultas possuem polietismo etário, que é estabelecido pela divisão de trabalho baseada em comportamento de abelhas que executam diversas tarefas ao longo de sua vida, sendo destinados às abelhas mais velhas, os serviços de forrageamento (Wiese, 2005). Perante esses fatores, pressupõe-se que estas abelhas poderiam estar sujeitas a maior número de estressores do que as abelhas mais jovens, que permanecem no interior da colônia e, conseqüentemente, apresentariam sistema imune mais eficiente. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que as abelhas sofrem variações em diferentes padrões imunológicos de acordo a idade, apresentando respostas, diferentes, porém compensatórias (Amdam et al. 2004; Schmid-Hempel, 2005). Sendo assim, estas informações podem indicar que as oscilações observadas no presente estudo, estão relacionadas com as diferentes respostas geradas conforme as idades em que as abelhas foram analisadas.

Além dessas explicações é possível levantar a hipótese do efeito do etanol utilizado no extrato nas expressões relativas observadas. Apesar das abelhas estarem naturalmente expostas ao etanol devido à fermentação das culturas nectaríferas, ainda não se tem conhecimento se as abelhas procuram o álcool, entretanto as campeiras produzem feromônios a partir da ingestão do álcool que regula o desenvolvimento e comportamento social (Leoncini et al. 2004; Castillo et al. 2012). Além desses, foi evidenciado efeitos negativos do consumo do etanol tais como, atividade locomotora,

sinais de estresse, desempenho e até reprodução (Hranitz et al. 2010; Mixson, et al. 2010; Sholz, 2013) . Entretanto, Antunez et al. (2008), ao realizar um estudo que tinha como objetivo verificar a eficiência do uso de extrato alcoólico de própolis como alternativa natural no controle de cria pútrida americana e verificar a toxicidade do extrato na alimentação das abelhas, verificaram que as abelhas que consumiram extratos de até 50% de álcool não apresentaram sinais de intoxicação e concluiu que o uso do extrato alcoólico de própolis no consumo das abelhas é seguro. Considerando tais afirmações pode-se inferir que o álcool presente no extrato pode ter interferido no comportamento das abelhas e conseqüentemente na expressão de algum gene, como também é possível sugerir uma indução no gene, uma vez que não se tem conhecimento sobre possíveis efeitos benéficos indiretos do extrato alcoólico no sistema imune das abelhas.

Sendo assim, nas condições do presente trabalho, verificou-se que a própolis pode induzir a expressão relativa dos genes *abaecin*, *hymenoptaecin*, *apidaecin* e *defensin1*, quando submetidas a desafio bacteriano. Entretanto, não se pôde caracterizar um tratamento com própolis que apresente uma maior expressão relativa para todos os genes simultaneamente.

Referências

Amdam, G.V., Simões, Z.L.P; Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O.; Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.*, **39**, 767-773.

Ansorge, S., Reinhold, D., Lendeckel, (2003) U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch.* **58**, 580-589.

Antunéz, K. Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., Zunino, P. (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet. Microbiol.* **131**, 324-331.

Cameron, C;R, Duncan, E.L., Dearden, P.K. (2013) Biased gene expression in early honeybee larval development. *BMC Genomic.*, **14**, 903.

Casteels, P. Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. Tempst, P. (1993) Funcional and Chemical Characterization of *Hymenoptaecin*, an antibacterial Polypeptide that is infection inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, **268**, 7044-7054.

Casteels, P. Ampe, C., Rivieri, L., Van Damme, J., Elicone, C., Flemming, M., Jacobs, F., Tempst, P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, **187**, 381-386.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. (1989) *EMBO J.* **8** (8), 2387-2391.

Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* **269**, 28569-28575.

Castillo, C., Chen, H., Graves, C., Maisonnasse, A., Conte, Y.L, et al. (2012) Biosynthesis of ethyl oleate, a primer pheromone, in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 404–416.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., Zhou, C., Hultmark, D. (2006) Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **15**, 645-656.

Evans, J.D., Pettis, J.S. (2005) Colony-level impacts of immune responsiveness in honeybees, *Apis mellifera*. *Evolution.* **59**, 2270-2274.

Evans, J., Wheeler, D.E. (2000) Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **15** (5), 597-602.

Fischer, G., Conceição, F.R., Leite, F.P.L., Dummer, L.A., Vargas, L.D., et al. (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, **25**, 1250- 1256.

Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A.M.P., Galleto, L., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J.J.G. (2009) Diversity, threats and conservation of native bees in Neotropics. *Apidologie*, **40**, 332-346.

Freitas, B.M., Pinheiro, J.N. (2010) Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecol. Aust.*, **14**, 282-298.

Frozza, C.O.S., Garcia, C.S.C., Gambato, G.; Souza, M.D.O.S. et al. (2013) Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem. Toxicol.* **52**, 137-142.

Heinzen, E.L. (2012) Extrato de Própolis no controle de Helmintoses em Bezerros. *Acta Vet. Brasilica.* **6**, 40-44.

Holt, L.H., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M. (2013) Chronic parasitization by *Nosema microsporidia* causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, **14**, 799.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium. (2006) Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature.* **443**, 931-949.

Hranitz, J.M., Abramson, C.I., Carter, R.P. (2010) Ethanol increases HSP70 concentrations in honeybee (*Apis mellifera* L.) brain tissue. *Alcohol.* **44**, 275-282.

Jiang, H. (2008) The biochemical basis of antimicrobial responses in *Manduca sexta*. *Insect Sci.* **15**, 53-66.

Kirkley, S.A. (1999) Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6** (5), 652-657.

Klaudiny, J., Albert, S., Bachanova, K., Kopernicky, J., Simuth, J. (2005) Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 11-22.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* **84**, 329.

Lemaitre, B., Reichhart, J., Hoffmann, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 14614-14619.

Leoncini, I., Conte, Y.L., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., et al. (2004) Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **101**, 17559–17564.

Lima, M.G. (2006) A produção de própolis no Brasil. São Sebastião Editora: São João da Boa Vista.

Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2011) CYP9Q-mediated detoxifications of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **12**, 657-62.

Mixson, T.A., Abramson, C.I., Bozic, J. (2010) The behavior and social communication of honey bees (*Apis mellifera carnica* Poll.) under the influence of alcohol. *Psychol. Rep.* **106**, 701–717.

Myiag, T., Peng Gh, Y.S., Chuang, R.Y., Mussen, E.C., Spivak, M.S., Doi, R.H. (2000) Verification of oxytetracycline resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in United States. *J. Invertebrate. Pathol.*, **75**, 95-96.

Niu, G., Johnson, R.M., Berenbaum, M.R. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. (2010) *Apidologie.* **42**, 79-87.

Orsatti, C.L., Missima, F., Pagliorone, A.C., Bachiega, T.F., Bufalo, C., Araujo, J.P., Sforcin, J. (2010) Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors

2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother. Res.* **24** (8), 1141-1146.

Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y. (2004) Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agri. Food Chem.* **52**, 1100-1103.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45.

Pott, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, H.R., Neumann, P., Settele, J. (2010) Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apicult. Res.*, **49**, 15-22.

Rolff, J., Reynolds, S.E. (2009) *Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms*. Oxford University Press, Sheffield.

Scharlaken, B., De Graaf, D.C., Goossens, K., Peelman, L. J., Jacobs, F. J. (2008) Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* **32** (8), 883-889.

Schmid-Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 529-551.

Scholz, H., Mustard, J. (2013) Invertebrate Models of Alcoholism. In: Sommer WH, Spanagel R, editors. *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction*: Springer Berlin Heidelberg. 433-457.

Sforcin, J.M., Bankova, V. (2011) Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.*, **133** (2), 25-360.

Sied, R., Meixner, M.D., Buchler, R. (2012) Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Apicult. Res.* **51** (4), 320-328.

Silva, B.B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V.J., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L. (2013) Anti-Inflammatory and Antimicrobial evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *J. Agri. Food Chem.* **61** (19), 4546-4550.

Simola, D.F., Wissler, L., Roux, J., Nygaard, S., Glastad, K.M. et al. (2013) Social insect genomes exhibit dramatic evolution in gene composition and regulation while preserving regulatory features linked to sociality. *Genome Res.* **23**, 11234-1247.

Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M. (2009) Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, **63**, 3016-3022.

Souza, E.A., Inoue, H.T., Gomes, S.M.A., Funari, S.R.C., Orsi, R.O. (2010) Propriedade Físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. *Arch. Zootec.* **59** (228), 571-576.

Souza, F.B.R., Fischer, G., Vargas, G.D. (2013) Efeito Antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. *Sci. Anim. Health.* **1** (1).

Sy, L.B., Wu, Y., Chiang, B., Wang, Y., Wu, W. (2006) Propolis extracts exhibit immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Internacional Immunopharmacology*, **6**, 1053- 1060.

Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaitre, B. (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactopn. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5** (1), 102-110.

Van Engelsdorp, D. Hayes, J. Jr., Underwood, R.M., Pettis, J.S. (2010) A survey of honey bee colony losses in the US, Fall 2008 to Spring 2009. *J. Apicult. Res.*, **49**, 7-14.

Wiese, H. (2005) *Apicultura Novos Tempos*. 2 ed. Guaíba: Agrolivros.

Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T., Muroga, K. (2002) A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white sopt syndrome virus. *Fish Shellfish Immun.* **13**, 391-403.

Yang, X., Cox-Foster, D. (2007) Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence an microbial challenge. *Parasitol.*, **134**, 405-412.

Zar, J.H. (2010) *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

CAPÍTULO III

**EFEITO DO CONSUMO DE PRÓPOLIS NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E MORTALIDADE DE ABELHAS *Apis mellifera* L.
SUBMETIDAS AO INSETICIDA FIPRONIL**

RESUMO: Os inseticidas representam o maior risco direto para os polinizadores, como as abelhas *Apis mellifera*, sendo responsável pela redução das populações de abelhas e da produção apícola, tornando necessária a busca por substâncias que possam contribuir na melhora da saúde dessas abelhas, como a própolis. Este estudo verificou o efeito do consumo do extrato alcoólico de própolis no comportamento, quando submetidas a DL_{50} (0,2 μ g/abelha) e subletal (1/500 DL_{50}), e mortalidade das abelhas *Apis mellifera* L. quando submetidas a diferentes doses do inseticida fipronil (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 μ g/abelha). Ao todo foram utilizadas quatro colmeias, uma para cada tratamento (0, 5, 10 e 15% de inclusão de própolis), e em três períodos (0,15 e 30 dias) para verificar o efeito dos tratamentos ao longo do experimento. Para a realização dos testes de mortalidade e de alterações comportamentais foram selecionadas as abelhas campeiras das colmeias tratadas. Para o teste de mortalidade, os dados foram analisados em modelo linear misto generalizado, adicionado do Teste de Tukey ($P < 0,05$) e a análise da avaliação das atividades comportamentais foi feita por (ANOVA) seguida do Teste de Tukey ($P < 0,05$). As colmeias que consumiram própolis apresentaram menor taxa de mortalidade quando comparados com a colmeia controle (0%), com exceção no dia 0 em que a colmeia controle não diferiu do tratamento 10%. Verificou-se ainda que as abelhas que receberam o tratamento 10% apresentaram as menores taxas de mortalidade nos dias 15 e 30 de coleta. Além disso, foi observada mortalidade de 23% nas abelhas quando submetidas a DL_{50} do fipronil. Nos testes de alterações comportamentais e locomotoras não foram observadas influências dos tratamentos com própolis. Concluiu-se que, para o presente estudo, a própolis influenciou na taxa de mortalidade e pode ter promovido um efeito protetor nas abelhas *Apis mellifera* L. quando submetidas a diferentes concentrações do inseticida fipronil, sendo ainda verificado que o tratamento 10% foi o mais eficaz, devido a ter apresentado as menores taxas de mortalidade nos dias 15 e 30.

Palavras-chave: colapso/ detoxificação/ fenilpirazóis/ inseticida/ polinizadores.

EFFECT OF PROPOLIS CONSUMPTION IN THE BEHAVIORAL CHANGES AND MORTALITY OF *Apis mellifera* L. BEES SUBMITTED TO PESTICIDE FIPRONIL

ABSTRACT: Pesticides pose the greatest direct risk for pollinators such as *Apis mellifera* bees, responsible for reducing bee populations and beekeeping, making it necessary to search for substances that can contribute to improving the health of these bees, such as propolis. Given this, the study found the effect of propolis alcoholic extract consumption behavior when subjected to DL_{50} (0.2 $\mu\text{g}/\text{bee}$) and sublethal (1/500 DL_{50}), and mortality of *Apis mellifera* L. bees submitted to different doses of the insecticide fipronil (0,05; 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{bee}$). Four colonies were used, one for each treatment (0, 5, 10 and 15% inclusion of propolis), and in three periods (0, 15 and 30 days) to determine the effect of the treatments throughout the experiment. To the achievement of mortality and behavioral changes tests the foraging bees from treated hives were selected. For the mortality test, the data were analyzed in generalized linear mixed model, added the Tukey test ($P < 0.05$) and the analysis of the assessment of behavioral activities was made by (ANOVA) followed by Tukey test ($P < 0.05$). Beehives who consumed propolis have a lower mortality rate compared to the hive control (0%), except on day 0 that the hive control did not differ from treatment 10%. It was also found that the hive that received treatment 10% was among the lowest mortality rates in the fifteenth and thirtieth collection day. Furthermore, the observed mortality was 23% in bees when subjected to LD_{50} . In tests of locomotor and behavioral changes were observed influences of treatments with propolis. It concludes that, for this study, propolis influenced the mortality rate and may have promoted a protective effect on bees *Apis mellifera* L. when subjected to different concentrations of the insecticide fipronil, and also, that the treatment 10% was effective due to having presented the lowest mortality rates in the 15 and 30. However, treatments with propolis did not influence the behavioral and motor changes.

Key-words: collapse / detoxification / pesticide / phenylpyrazoles / pollinators

1. Introdução

Dentre os polinizadores, as abelhas são responsáveis pela reprodução cruzada de aproximadamente 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo sendo a *Apis mellifera* a mais utilizada em serviços de polinização (Ricketts et al., 2008). Porém, seu comportamento de forrageamento a expõe a uma ampla diversidade de fitoquímicos e agroquímicos, tais como o inseticida fipronil (Mao et al., 2011).

Os inseticidas representam o maior risco direto para os polinizadores e diversos trabalhos demonstram seus impactos negativos tanto em abelhas *Apis mellifera* L. (Shires et al., 2006; Desneux et al., 2007) como em abelhas nativas (Gels et al., 2002). Os polinizadores podem ser expostos aos inseticidas durante sua aplicação por meio do contato com os resíduos ou pela ingestão de pólen, néctar ou fluido (gotas de orvalho, ou xilema) contaminados (Ellis, 2010).

O efeito dos inseticidas sobre a fauna de polinizadores atua diretamente como responsável pela redução das populações de abelhas e da produção apícola e, indiretamente, pelas perdas na produção de diversas culturas agrícolas (Freitas; Pinheiro, 2012). A exposição prejudica o comportamento de forrageamento das abelhas (Colin et al., 2004); reduz a longevidade das operárias e rainha (Pettis et al., 2004); afeta a vitalidade da colônia, dentre outras (Deusneux et al., 2007; Belien et al., 2009; Aliouane et al., 2009; Gregorc; Ellis, 2011). Estes estudos apontam os impactos negativos dos agroquímicos nas abelhas, porém existem poucas pesquisas que visam encontrar alternativas para diminuir tais efeitos. Dentro deste contexto, se torna necessária a busca por substâncias que possam contribuir na melhora da saúde destas abelhas, tal como a própolis.

A própolis apresenta composição complexa, tendo sido identificadas mais de 300 substâncias diferentes, destacando-se dentre eles, o grupo dos flavonoides, responsáveis por diversos efeitos biológicos, como a ação antiviral, antifúngica, antibacteriana, dentre outras (Kumazawa et al., 2004; Vargas et al., 2004; Valente, 2011). Apesar de seu consumo ter sido mais documentado em humanos, as implicações da utilização da própolis em animais têm sido relatadas (Lana et al., 2007; Lustosa et al., 2008; Valero et al., 2014). Entretanto, trabalhos que verifiquem a influencia do consumo da própolis por abelhas *Apis mellifera* são escassos. Niu et al., (2010), ao

realizarem um trabalho em laboratório visando estudar a toxicidade das micotoxinas nas abelhas (*Apis mellifera*), evidenciaram que ao fornecer própolis para as abelhas houve redução das taxas de mortalidade sugerindo assim que a própolis pode ter a função adjuvante para detoxificação.

O metabolismo ou detoxificação é o mecanismo que permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo (Fukuto; Mallipudi, 1983). A degradação do inseticida pode ocorrer por vários processos metabólicos nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto (Hemingway, 2000).

Diante do exposto, este estudo busca verificar se o consumo do extrato alcoólico de própolis influencia no comportamento das abelhas *Apis mellifera* L. quando submetidas as DL_{50} (0,2 µg/abelha) e subletal (1/500 DL_{50}), e também na mortalidade após exposição a diferentes concentrações de fipronil (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 µg/abelha).

2. Material e métodos

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no apiário do setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, localizado na Fazenda Experimental Lageado da UNESP, *campus* de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22°49'S e 48°24'O, com clima *Cfa* e altitude média de 623 metros.

2.2. Produção e extração da própolis

Para a produção da própolis foram utilizadas cinco colmeias, diferentes das utilizadas no experimento. A própolis utilizada no projeto foi obtida no próprio apiário do setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu, sendo que a produção foi por meio do uso de coletores do tipo “tela plástica”. Após sua retirada da colmeia, a própolis foi acondicionada e mantida em freezer a -10°C. A extração da própolis da tela foi realizada por meio de fricção (Lima, 2006).

2.3 Colmeias utilizadas

Para a realização do experimento foram utilizadas quatro colmeias, uma para cada tratamento (0, 5, 10 e 15% de extrato alcoólico de própolis preparado no xarope de mel). As abelhas *Apis mellifera* africanizadas foram alojadas em colmeias padrão modelo Langstroth, contendo dez quadros, pintados externamente com tinta óleo de coloração verde claro, mantidas sobre cavaletes de 50 cm de altura e numeradas para facilitar a identificação. As colônias selecionadas foram manejadas antes do início dos experimentos, com intuito de padronizar a população de abelhas e quadros de cria.

2.4. Tratamentos

Para o preparo dos extratos alcoólicos de própolis (EAP), toda a própolis produzida foi misturada e mantida em freezer a -20°C . Depois de congelada, a própolis foi triturada e os EAP foram preparados na proporção de 30% (sendo adicionados 30 gramas de própolis e completado seu volume com álcool etílico 70%). As soluções permaneceram ao abrigo da luz, sob agitação frequente, durante sete dias. Decorrido este período, as soluções foram filtradas e os EAP obtidos (Souza et al., 2010; Heinzen et al., 2012).

O EAP obtido foi utilizado para os seguintes tratamentos: Tratamento controle (xarope de mel e água destilada na proporção 1:1), Tratamento 5% (50 ml de EAP em 950 ml de xarope), Tratamento 10% (100 ml de EAP em 900 ml de xarope) e Tratamento 15% (150 ml de EAP em 850 ml de xarope).

A distribuição dos tratamentos foi realizada ao acaso, sendo fornecidos semanalmente 250 ml, em alimentadores tipo *Boardman* ao longo de 30 dias.

2.5. Coleta das abelhas

Foram realizadas três coletas para verificar o efeito dos tratamentos ao longo do experimento (0, 15 e 30 dias). Entre as 07h00 e 08h00 foram realizadas as coletas das abelhas campeiras por meio de caixa armadilha posicionada no alvado das colmeias. Estas abelhas foram anestesiadas em freezer a -10°C por 1 a 2 minutos de forma a possibilitar a futura realização dos testes. Para todos os dias de coleta foram realizados os testes comportamentais e mortalidade.

2.6. Agrotóxico

O ingrediente ativo fipronil foi utilizado a partir da formulação comercial utilizada em campo: Regente 800WG® - 800 g i.a. fipronil/kg – (80% m/m). Ingredientes Inertes – 200 g/kg (20% m/m) (BASF Agri-Production SAS, Saint Aubin Les Elbeuf, Cleon, França). As doses utilizadas neste estudo (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 µg fipronil/abelha) foram baseadas na DL₅₀ observada por Zaluski et al. (2015). Para a obtenção das doses foi preparada uma solução de 1g L⁻¹ de Regent 800WG® diluída em água destilada, sendo as demais doses preparadas a partir dessa solução. Para todas as diluições utilizadas nos testes, foi considerada apenas a quantidade de ingrediente ativo fipronil, sem considerar os ingredientes inertes. As soluções foram agitadas vigorosamente durante a sua preparação e antes de sua utilização.

2.7. Contaminação, alteração comportamental e teste de mortalidade

As abelhas coletadas foram distribuídas em caixas plásticas (10x20x20cm) identificadas de acordo com a dose de fipronil e tratamento proposto. Os testes foram feitos em triplicata. Para cada repetição, foram coletadas 50 abelhas de cada tratamento e alojadas em 5 caixas plásticas. Cada caixa correspondeu a uma dose de fipronil, sendo então alojadas 10 abelhas para cada dose proposta.

Após serem alojadas, estas abelhas permaneceram três horas em jejum, anterior ao início dos testes, a fim de garantir o consumo do alimento contaminado.

Para realizar a contaminação das abelhas, foi fornecido 1 ml de alimento (xarope de açúcar – 50%) disponibilizados em recipientes plásticos (50x10x10mm). O alimento foi contaminado de forma a garantir que no consumo de 50µl, volume correspondente à capacidade média da vesícula melífera (Thompson;Hunt, 1999), fosse ingerido as doses descritas anteriormente. Após três horas de início do experimento o xarope contaminado foi substituído por xarope de açúcar.

Antes de iniciar os testes, as abelhas que apresentaram alterações comportamentais, ou estado de letargia foram rejeitadas e substituídas por abelhas saudáveis. As abelhas foram mantidas em ambiente sem utilização de iluminação artificial e com temperatura ambiente (25°C±1), com umidade ente 60% e 65%.

As alterações comportamentais (agitação, convulsão, tremores e paralisia) foram observadas 30, 60, 90 e 120 minutos após o período de ingestão (3h) do alimento, sendo cada grupo de 10 abelhas observadas ao longo de 2 minutos.

Decorridas 24h do início dos testes, o número de abelhas mortas em cada tratamento foi contabilizado e os resultados utilizados para definição da taxa de mortalidade e análise dos tratamentos. Para todos os testes, foi realizado um controle negativo, que consistiu em três caixas contendo abelhas sem influência de tratamento e agrotóxico que receberam xarope de açúcar, a fim de verificar a mortalidade ocasionada naturalmente.

2.8. Teste de locomoção

Para a verificação da ocorrência de alterações motoras em abelhas expostas após ingestão de fipronil foram utilizadas 120 abelhas por tratamento e dia de coleta (0, 15 e 30), totalizando 1440 abelhas. As abelhas foram submetidas à dose letal (DL_{50}) e subletal ($1/500DL_{50}$) de ingestão verificadas no trabalho de Zaluski et al. (2015), utilizando o mesmo método descrito para os testes de mortalidade.

A atividade motora das abelhas foram avaliadas nos tempos 1 e 4 horas após sua exposição ao fipronil, considerando a possível degradação do fipronil em metabólitos nesses intervalos de tempo (Narahashi et al., 2010). Os testes foram realizados em laboratório, utilizando uma caixa de observação de madeira (60x35x04cm), dividida em cinco raias (50x05x04 cm), contendo uma lâmpada fluorescente na parte superior, coberta com vidro para permitir a observação das abelhas. Os testes foram realizados em local escuro, com caixa inclinada em 45°C e a lâmpada acesa, estimulando a locomoção das abelhas por fototaxia positiva (Lambin et al. 2001). As abelhas foram liberadas individualmente em cada raia, sendo anotado o tempo gasto para percorrer 50 cm. Foram utilizadas 10 abelhas para cada dose/ tratamento testado e para cada intervalo de tempo avaliado. Os testes foram realizados em triplicata. Foi realizado um controle negativo, que consistiu da coleta de abelhas sem influência de tratamento e agrotóxico.

2.9. Procedimento estatístico

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com esquema fatorial 4 x 5 x 3, sendo quatro tratamentos com própolis, cinco doses e três dias. Para análise da mortalidade, foi realizado o cálculo da taxa de mortalidade encontrada após ingestão do inseticida fipronil. A taxa foi calculada de acordo com o número de abelhas mortas encontradas em cada 10 abelhas, nas repetições.

Os dados de taxa mortalidade foram submetidos à análise de variância (procedimento PROC GLIMMIX), com tratamento, dose, dia e suas interações como efeitos fixos (MODEL), replicação (n=3) como efeito aleatório (RANDOM), e a média dos quadrados mínimos (LSMEANS) ajustada pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas no “SAS EAS – Education Analytical Software”, versão 9.3 (SAS, 2013).

Os resultados da avaliação de atividade motora foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey (Zar, 2010).

Para todas as análises foi considerado o nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

A partir da análise dos dados de mortalidade (análise de variância para 3 fatores), foi verificado efeito de tratamento ($P > 0,0001$), dose ($P > 0,0001$), dia ($P > 0,0001$) e interação entre tratamento e dia ($P > 0,0001$) e entre dose e dia ($P = 0,021$). Assim sendo, a interpretação dos resultados foi realizada por meio do desmembramento das interações, conforme demonstrado nas Tabelas 01 e 02.

Na Tabela 1 encontram-se os valores das médias da taxa de mortalidade dos tratamentos em relação aos dias de coleta.

Tabela 1: Médias e Erro Padrão Médio (EPM) das taxas de mortalidade encontradas em abelhas *Apis mellifera* L. nos tratamentos contendo própolis (0, 5, 10 e 15%), após serem submetidas a diferentes doses de fipronil, ao longo do tempo.

Dias	Tratamento (%)				EPM
	0	5	10	15	
0	0,16aC	0,02bB	0,07abB	0,02bB	0,03
15	0,91aA	0,29bA	0,13cAB	0,15cB	0,03
30	0,62aB	0,14cB	0,14cA	0,3bA	0,03
EPM	0,03	0,03	0,03	0,03	

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de probabilidade.

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os dados observados na tabela 1 foi possível verificar que a colmeia do tratamento controle (0%) não diferiu apenas da colmeia do tratamento 10% no dia 0. Para os demais dias de coleta, a colmeia do tratamento controle apresentou os maiores valores de taxa de mortalidade quando comparada as colmeias que receberam os tratamentos contendo própolis (5, 10 e 15%). Além disso, verificou-se que as colmeias dos tratamentos 10 e 15% apresentaram menores taxas de mortalidade aos 15 dias; e aos 30 dias observaram-se menores taxas de mortalidade para as colmeias do tratamento 5 e 10%.

Quando comparamos as taxas de mortalidade ao longo do tempo dentro de cada tratamento, foi possível observar que para as colmeias dos tratamentos controle (0%) e 5% as maiores taxas de mortalidade ocorreram no dia 15. Para a colmeia do tratamento 10%, a mortalidade observada no dia 30 diferiu apenas do dia 0 de coleta e por fim que a colmeia do tratamento 15% apresentou maior taxa de mortalidade para o dia 30 de coleta.

Na Tabela 2 encontram-se os valores das médias da taxa de mortalidade das doses de fipronil em relação aos dias de coleta.

Tabela 2: Médias e Erro Padrão Médio (EPM) das taxas de mortalidade resultantes do consumo de diferentes doses de fipronil pelas abelhas *Apis mellifera* L., ao longo do tempo.

Dias	Dose ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					EPM
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	
0	0,03aB	0,03aB	0,04aB	0,05aB	0,09aB	0,3
15	0,27cA	0,29bcA	0,37abcA	0,44abA	0,48aA	0,3
30	0,2bA	0,19bA	0,23bA	0,43aA	0,46aA	0,3
EPM	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de probabilidade.

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade.

A partir dos dados da tabela 2, pode-se observar que a taxa de mortalidade apresentada para as abelhas que receberam a dose 0,4 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ diferiu das que ingeriram as doses 0,05 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ no dia 15 de coleta e que as abelhas que foram submetidas as doses 0,3 e 0,4 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ apresentaram maior taxa de mortalidade que as que consumiram as demais doses no dia 30 de coleta, quando realizada a comparação entre as taxas de mortalidade de cada dose utilizada no experimento.

Quando verificamos o efeito do dia de coleta dentro de cada dose, foi possível observar que para todas as doses de fipronil as taxas de mortalidade das abelhas encontradas nos dias 15 e 30 não diferiram entre si.

Em relação aos testes de alterações comportamentais, foram observados para todas as abelhas (independente das doses de fipronil e tratamentos), tremores, paralisia e convulsões em todos os tempos de observação (30, 60, 90 e 120 minutos).

Os resultados obtidos pelas análises de alterações locomotoras nos dias 15 e 30 de experimento estão dispostos na tabela 3. Foi observada apenas diferença significativa entre as médias do controle negativo (sem influência de tratamento e fipronil) com os tratamentos utilizados (0, 5, 10 e 15%) no estudo.

Tabela 3: Médias e desvio-padrão do tempo (s) gasto pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas para percorrer 50 cm após exposição à DL₅₀ e dose subletal (SL) do inseticida fipronil, nos tempos 1 e 4 horas, nos dias 15 e 30.

Dia 15				
Tratamento	1h	4h	1h	4h
	DL ₅₀ (0,2µg/abelha)	DL ₅₀ (0,2µg/abelha)	SL _(0,0004µg/abelha)	SL _(0,0004µg/abelha)
CN	11,1±2,7B	10,4±9,4B	11,1±2,7B	10,4±9,4B
0%	21,7±11,3A	19,6±10,3A	23,3±14,5A	22,5±10,8A
5%	25,8±14,1A	20,4±9,8A	20,5±9,1A	20,7±10,2A
10%	24,2±14,8A	21,4±12A	19,7±8,4A	17,7±9,8A
15%	21,4±8,9 ^a	21,9±10,1A	18,8±7,5A	23,3±10,2A
Dia 30				
Tratamento	1h	4h	1h	4h
	DL ₅₀ (0,2µg/abelha)	DL ₅₀ (0,2µg/abelha)	SL _(0,0004µg/abelha)	SL _(0,0004µg/abelha)
CN	11,8±5,1B	11,4±3,9B	11,8±5,1B	11,4±3,9B
0%	21,4±8,3 ^a	19,6±10,4A	22,8±8,9A	20,5±8,8A
5%	21,3±10,7A	18,2±7,4A	20,7±9,6A	21,4±9,5A
10%	22,7±10,4A	20,2±12,2A	21±9,2A	21,2±8,6A
15%	19,8±8,6 ^a	24,5±10,4A	20,8±10,9A	20,5±8,8A

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

CN: Controle Negativo, abelhas sem influência de tratamento e fipronil.

4. Discussão

Em relação aos dados obtidos nos testes de mortalidade (tabelas 1 e 2), a amostra do controle negativo (sem influência de tratamento e fipronil) realizada não apresentou mortalidade em nenhum dos dias de coleta (0, 15 e 30 dias), o que sugere que a mortalidade verificada nas colmeias tratadas não pode ser atribuída a influência de fatores externos, tais como frio, calor, pouca circulação de ar.

Quando analisamos as maiores taxas de mortalidade observadas nas abelhas do tratamento controle (0%) em relação às que receberam os demais tratamentos (5, 10 e 15%), é possível inferir que a própolis contribuiu para redução nas mortes ocasionadas pelo fipronil, sendo ainda verificado que as abelhas da colmeia que recebeu o tratamento 10% esteve entre as menores taxas de mortalidade nos dias 15 e 30 de coleta.

A queda nos valores de mortalidade corroboram com o estudo de Niu et al. (2010), que também observaram redução na mortalidade das abelhas (*Apis mellifera*) submetidas à contaminação por aflatoxina, quando alimentadas com diferentes concentrações de própolis.

Zaluski et al. (2015) observaram que a DL_{50} para ingestão do inseticida fipronil foi de 0,2µg/abelha, entretanto, quando utilizamos a mesma dose, nas condições deste experimento, observamos mortalidade de 23% das abelhas após 30 dias de tratamento (vide tabela 2), sugerindo um possível efeito protetor devido a alimentação prévia com EAP.

Uma possível justificativa para a própolis ter para esse possível efeito protetor e a redução da taxa de mortalidade das abelhas no presente estudo, poderia estar na própria composição da própolis. Dentre as diversas substâncias complexas presentes, quatro compostos foram identificados e relacionados com a melhora do sistema de detoxificação das abelhas melíferas, sendo eles a pinobancsina, a pinobancsina 5-metil éter, a pinocembrina e o ácido p-cumárico (Alencar et al., 2005; Mao et al., 2013). Estes compostos são abundantes nos exsudatos do broto dos álamos (*Populus* sp.) e de outras plantas da família *Salicacea*, que estão entre as resinas de árvores coletadas pelas abelhas para a produção de própolis (Greenway et al., 1990). Entretanto, estas substâncias também foram identificadas na própolis proveniente de *Baccharis dracunculifolia*, que representa a maior parte da origem vegetal da própolis produzida na região de Botucatu (Bankova et al., 1999; Marcucci et al., 2001; Alencar et al., 2005).

Em relação as alterações comportamentais observadas de tremor, paralisia, e convulsões, pode-se sugerir que a própolis não apresentou efeito de melhora nos sintomas observados na intoxicação das abelhas. Um dos motivos dessas alterações pode ser devido à ação antagonista do fipronil sobre o neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA), que atua impedindo a entrada dos íons Cl^- nas células nervosas de insetos intoxicados, causando atividade neural excessiva, paralisia e morte (Narahashi et al., 2010).

Quando analisados os testes de locomoção, pode se observar que não houve interferência dos tratamentos para nenhum dos grupos submetidos as DL_{50} e SL,

independente dos dias, apresentando valores de tempo (em segundos) maiores do que o grupo do controle negativo (sem interferência de tratamento e fipronil). Estes resultados sugerem que a própolis não apresentou efeito para as alterações locomotoras das abelhas expostas ao agroquímico. Os valores de média de tempo (em segundos) encontrados no presente estudo para as abelhas submetidas a DL₅₀ e SL para todos os tratamentos são próximos aos valores encontrados por Zaluski et al. (2015) quando expuseram as abelhas a DL₅₀ e SL do inseticida fipronil, nas mesmas condições edafoclimáticas.

Neste trabalho o álcool foi utilizado como solvente da própolis fornecida para as abelhas, tornando assim importante ressaltar seus possíveis efeitos. Diversos autores relataram que o efeito do consumo de álcool pelas abelhas *Apis mellifera* pode prejudicar seu comportamento social, afetando a atividade locomotora, desempenho, reprodução, redução na atividade de forrageamento, interrupção na divisão de trabalho, causar efeitos analgésicos, sinais de estresse e aumento da defensividade em abelhas africanizadas (Abramson et al., 2007; Cakmak et al., 2009; Scholz; Mustard, 2013; Giannoni-Guzmán et al., 2014). Porém, as abelhas que receberam os tratamentos contendo EAP (5, 10 e 15%) apresentaram resultados semelhantes ao das abelhas do tratamento controle, sugerindo que o álcool não apresentou efeitos no comportamento das abelhas estudadas. Mixson et al. (2010) também não observaram alterações comportamentais nem interrupção de trabalho, sendo ainda relatado aumento de mobilidade e movimentação para as abelhas que consumiram alimento contendo 2,5% de álcool. Além disso, foi verificado que os efeitos do álcool desaparecem em 24 horas após o consumo de alimento contendo de 5 a 10% de álcool (Maze et al., 2006). Sendo ainda relatado por Antunéz et al. (2008), ao realizarem um experimento que visava verificar o efeito do extrato alcoólico de própolis no controle da cria pútrida americana, que o consumo do extrato alcoólico de própolis de até 50% não é prejudicial para a saúde das abelhas.

Sendo assim, para as condições do presente trabalho, conclui-se que a própolis pode ter apresentado efeito protetor e influenciado na taxa de mortalidade das abelhas *Apis mellifera* L. quando submetidas à diferentes concentrações do inseticida fipronil, sendo ainda verificado que o tratamento 10% foi mais eficaz, devido ter apresentado as menores taxas de mortalidade nos dias 15 e 30. Porém, a própolis não apresentou

influência nas alterações comportamentais e motoras, sendo evidenciada a necessidade de estudos mais aprofundados que possam contribuir com a investigação deste produto no sistema de detoxificação das abelhas melíferas.

Referências

Abramson, C.I., Wells, H., Bozic, J. (2007) A social insect model for the study of ethanol induced behavior: The honey bee. In: Yoshida R, editor. Trends in Alcohol Abuse and Alcoholism Research. Hauppauge, N Y: Nova Science Publishers. p. 197–218.

Alencar, S.M., Aguiar, C.L., Guzmán, J.P., Park, Y.K., (2005) Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. Cienc. Rural **35**, 909-915.

Aliouane, Y., El Hassani, A.G., Armengaud, C. Lambin, M., Gauthier, M. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. Environ. Toxicol. Chem., **28**, 113-122.

Antunéz, K. Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., Zunino, P. (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. Vet. Microbiol. **131**, 324-331.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Sforcin, J.M., Frete, X., Kujumgiev, A. et al. (1999) Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. Zeit. fur Natur. **54**, 401-405.

Belien, T., Kellers, J., Heylen, k., Keulemans, W., Billen, J., Arckens, L., Huybrechts, R., Gobin, B. (2009) Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. **74**, 245-253.

Cakmak, I., Abramson, C.I., Seven-Camak, S., Nentehev, P., Wells, H. (2009) Observations of ethanol exposure on the queen honey bee *Apis mellifera anatoliaca* Maa: a preliminary note. B. Insectol. **62**, 99–101.

Colin, M.E., Bonmatin, J.M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., Vermandere, J.P. (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to sublethal effects induced by systemic insecticides. Arch. Environm. Contam. Toxicol. **47** (3), 587-395.

Deusneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. (2007) The sub lethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Ann. Rev. Entomo. **52**, 81-106.

Ellis, M.D. Pesticides and bee toxicity. (2010) American Bee Journal, **150**, 485-486.

Freitas, B.M., Pinheiro, J.N. (2012) Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. MMA, Brasília.

Fukuto, T. R., Mallipudi, N.M. (1983) Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification, In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (ed.). Pest resistance to pesticides: challenges and prospects. Plenum Press, New York, United States of America, 1983. p.557-578.

Gels, J.A., Held, D.W., Potter, D.A. (2002) Hazards of insecticides to the bumble bees *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) foraging on flowering white clover in turf. Journal of Economic Entomology. **95**, 722-728.

Giannoni-Guzmán, M., Giray, T., Agosto-Rivera, J.L., Stevison, B.K., Freeman, B., Ricci, P., Brown, E.A., Abramson, C.I. (2014) Ethanol-Induced Effects on Sting Extension Response and Punishment Learning in the Western Honey Bee (*Apis mellifera*). PLoS ONE. **9**, e100894.

Greenway, W., Scraysbook, T., Whately, F.R. (1990) The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. Bee World **71**, 107-118.

Gregorc, A., Ellis, J. (2011) Cell death in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. Pest. Biochem. Physio. **99**, 200-207.

Heinzen, E.L. (2012) Extrato de Própolis no controle de Helmintoses em Bezerros. Acta Vet. Brasilica. **6**, 40-44.

Hemingway, J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect. Biochem. Molec. Biol. **30**, 1009–1015.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. **84**, 329-339.

Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. Arch. Insect Biochem. Physiol. **48**, 129-134.

Lana, R.P., Carmadelli, M.M.L., Rodrigues, M.T., Eifert, E.C., Oliveira, M.V.M., Júnior, D.S., Oliveira, J.S. (2007) Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. Rev. Bras. Zoo. **36** (1), 191-197.

Lima, M.G. (2006) A produção de própolis no Brasil. São Sebastião Editora: São João da Boa Vista.

Lustosa, S.R., Galindo, A.B., Nunes, L.C.C., Randau, K. P., Neto, P.J.R. (2008) Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev. Bras. Farm. **18**, 447-454.

Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2011) CYP9Q-mediated detoxifications of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). Proc. Natl. Acad. Sci. **12**, 657-62.

Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2013) Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. Proc. Natl. Acad. Sci. **8**, 842-846.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N. (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J. Ethnopharmacol. **74** (2), 105-112.

Maze, I. A. Wright, G. A., Mustard, J. A. (2006) Acute ethanol ingestion produces dose-dependent effects on motor behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). J. Insect. Physiol. **52**, 1243-1253.

Mixson, T.A., Abramson, C.I., Bozic, J. (2010) The behavior and social communication of honey bees (*Apis mellifera carnica* Poll.) under the influence of alcohol. Psychol. Rep. **106**, 701–717.

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L., Yeh, J.Z. (2010) Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. Pestic. Biochem. Physiol. **97** (2), 149-152.

Niu, G., Johnson, R.M., Berenbaum, M.R. (2010) Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. Apidologie.

Pettis, J., Collins, A.M., Wilbanks, R., Feldauer, M.F. (2004) Effect of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. Apidologie. **35** (6), 605-610.

Ricketts, T.H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. et al. (2008) Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? Ecol. Lett. **11**, 499-515.

SAS EAS (2013) – Education Analytical Software, version 9.4. Cary: SAS Institute.

Scholz, H., Mustard, J. (2013) Invertebrate Models of Alcoholism. In: Sommer WH, Spanagel R, editors. Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction: Springer Berlin Heidelberg. 433–457.

Shires, W., Murray, A., Debray, P., Le Blanc, J. (2006) The effects of a new pyrethroid insecticide WL-85871 on foraging honey bees (*Apis mellifera* L.) Pestic. Sci. **15**, 491-499.

Souza, E. A. Inoue, H.T., Gomes, S.M.A., Funari, S.R.C., Orsi, R.O. (2010) Propriedade Físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. Arch. Zootec. **59** (228), 571-576.

Thompson, H.M., Hunt, L.V. (1999) Extrapolating from honeybees to bumble bees in pesticide risk assessment. Ecotoxicology. **8** (3), 147-166.

Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M. (2011) Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food Chem. Toxicol. **49**, 86-92.

Valero, M.V. Prado, R.M., Zawadzi, F. Eiras, C.E., Madrona, G.S., Prado, I.N. (2014) Propolis and essential oils additives in the diets improved animal performance and feed efficiency of bulls finished in feedlot. Acta Sci. **36** (4), 419-426.

Vargas, A.C., Loguercio, A.P., Witt, N.M., Costa, M.M., Sá e Silva, M., Vianna, L.R. (2004) Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. Cienc. Rural **34**, 159-163.

Zaluski, R.; Kadri, S.M.; Alonso, D.P.; Ribolla, P.E.M.; Orsi, R.O. (2015) Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. Environ. Toxicol. and Chem. **34** (5), 1062-1069.

Zar, J.H. (2010) Biostatistical analysis. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

IMPLICAÇÕES

Devido as suas diversas propriedades biológicas, a própolis é popularmente conhecida como um antibiótico natural, sendo utilizada pelos seres humanos há gerações. Atualmente, sabe-se que além desta função, a própolis apresenta diversas outras funções de interesse da sociedade, como ação antiviral, antifúngica, antioxidante, anticancerígena, dentre tantas outras. Essas propriedades fazem deste produto apícola alvo de diversas pesquisas científicas como também da indústria. Atualmente é utilizada na fabricação dos mais diversos produtos comerciais, que abrangem desde produtos estéticos até terapêuticos.

Concomitantemente ao desenvolvimento de produtos à base de própolis, a comunidade científica tem realizado diversos estudos que caracterizam e comprovam suas propriedades. Entre os estudos de interesse zootécnico, estão os que utilizam a própolis com propósito de evidenciar seus benefícios em prol dos animais domésticos. Entretanto, são escassos os trabalhos que tem como objetivo verificar os efeitos deste produto apícola nas abelhas *Apis mellifera* africanizadas. O presente estudo teve como objetivo verificar qual a influência do consumo da própolis nas abelhas no sistema imune e expressão dos genes após desafio bacteriano e detoxificação frente ao agroquímico fipronil. Foi observado que a própolis reduziu a mortalidade das abelhas testadas com inseticida fipronil e que o consumo de própolis promove a indução de genes relacionados à imunidade. Sendo assim, este estudo contribuiu com novas informações pertinentes quanto as possíveis funções que a própolis pode desempenhar quando consumidas pelas abelhas, além de ter sido testado e observado um modo de fornecimento prático e aplicável da mesma.

Por fim, espera-se que com os dados verificados neste trabalho, novas pesquisas sejam realizadas, a fim de averiguar os efeitos do consumo da própolis, bem como possíveis efeitos diferentes de outros tipos de própolis.