

Lucilene de Abreu

**INTERFERÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO GENETICAMENTE  
MODIFICADO EM COLÔNIAS DE *Apis mellifera* E DETECÇÃO  
DA OCORRÊNCIA DE PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS EM MEL**

Tese submetida ao Programa  
de Pós Graduação em  
Recursos Genéticos Vegetais  
da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção  
do título de Doutora em  
Ciências.

Orientador: Prof. PhD. Afonso  
I. Orth

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Abreu, Lucilene de  
Interferência do pólen de milho geneticamente modificado  
em colônias de *Apis mellifera* e detecção da ocorrência de  
proteínas transgênicas em mel / Lucilene de Abreu ;  
orientador, Afonso Inácio Orth - Florianópolis, SC, 2015.  
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Abelhas. 3.  
Mortalidade em *Apis mellifera*. 4. Transgenia. 5. Proteína  
Cry. I. Orth, Afonso Inácio. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais. III. Título.

# Interferência do pólen de milho geneticamente modificado em colônias de *Apis mellifera* e detecção da ocorrência de proteínas transgênicas em mel

por

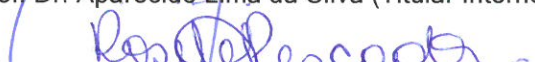
**Lucilene de Abreu**


Tese julgada e aprovada em 18/12/2015, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:


  
Prof. Dr. Afonso Inácio Orth (Presidente - CCA/UFSC)

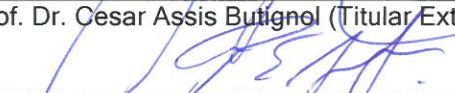
  
Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva (Titular Interno - CCA/UFSC)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador (Titular Interno - CCA/UFSC)

  
Prof. Dr. Geraldo Moretto (Titular Externo - FURB/SC)

  
Dr. Haroldo Tavares Elias (Titular Externo - EPAGRI/SC)

  
Prof. Dr. Cesar Assis Butignol (Titular Externo - CCA/UFSC)

  
Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, dezembro de 2015



Este trabalho é dedicado a Gládis, Renato, Luis Carlos e Lucas, que sempre acreditaram e tornaram esta trajetória possível.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus guris: Luis Carlos Borsuk e Lucas de Abreu Borsuk, por fazerem parte desta jornada, sempre demonstrando companheirismo, compreensão, paciência e apoio. Amo vocês!

A minha família amada, que sempre torceu, apoiou e acreditou: Gládis de Abreu Zanotto, Renato Artidoro Zanotto, Rodrigo Zanotto e Renata Zanotto;

Ao professor, orientador e amigo Dr. Afonso Inácio Orth, pelo apoio, confiança e consideração durante todo o período de doutorado e por toda sua luta em reativar a Cidade das Abelhas, demonstrando seu compromisso e engajamento pelos polinizadores;

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia Agrícola do CCA-UFSC: Prof. Dr. Cesar Assis Butignol, Biól. Dr. James Arruda Salomé, Eng. Agr. Dr. André Amarildo Sezerino, Eng. Agr. MSc. Ricardo Felipini, Eng. Agr<sup>a</sup>. Mayara Martins Cardoso, Eng. Agr<sup>a</sup>. MSc. Fabiane dos Santos, Eng. Agr<sup>a</sup>. Dra. Hellen Aparecida dos Santos, Biól. MSc. Marcia Regina Faita, Eng. Agr<sup>a</sup>. Viviane Bastos, Eng. Agr. Lucas Arantes Frishenbruder, Eng. Agr<sup>a</sup> Anna Cristina Xavier, aos estudantes de Agronomia: Maria Gabriela Santana Scherer, Crystiane Bropp, Bruno Pirolli, Anderson Kolb, Augusto Schutz Ferreira, Luiz Zanfelici e Cícero e pela ótima convivência, por toda a ajuda no trabalho, pelas parcerias no café, chimarrão e festas;

A abelha May (Mayara Martins Cardoso) por toda paciência e generosidade comigo, e por ser esta pessoa incrível, de ótimo coração;

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari e à professora Dra. Eunice Nodari, pelo incentivo, apoio e amizade;

Aos colegas discentes do RGV pelos momentos preciosos de fuga das rotinas laboratoriais tomando um café na padaria do alemão, discutindo a revolução: Lido Borsuk, Paula Sete, Luciano e Morgana Lopes;

Ao colega Eng. Agr. Daniel Ferreira Holderbaum, por todo apoio nas análises e procedimentos laboratoriais;

Aos profissionais de segurança e limpeza da Cidade das Abelhas: Rubens, Moisés, Luciano, Balbino, Marcio e Clodoaldo por todo o auxílio e companhia durante o trabalho;

A Federação das Associações de Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina, em especial ao Presidente Nésio Fernandes de Medeiros, por todo apoio e incentivo;

Aos egressos e estudantes do curso de agronomia da Unochapecó, que me permitiram aprender e ensinar, sempre em busca de um mundo mais justo e humano;

Aos afilhados Alexandre Grosmann e Matheus Marchioro, por sempre me alegrarem, e a amiga e comadre de uma vida Rosangela Marchioro, pelo carinho e paciência;

Aos meus amigos professores da Unochapecó: Eng. Agr<sup>a</sup>. MSc. Lucia Salengue Sobral, Eng. Agr. MSc. Gelso Marchioro, Licenciada em Matemática Claudia Grando, pelo apoio, amizade e paciência durante minhas ausências;

A meus pais Antonio e Thereza (*in memoriam*), irmãos Fernando Batista de Abreu e Regina Maria de Abreu (*in memoriam*), mesmo ausentes, vocês estão no meu coração;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento desta Tese, muito obrigado.



## RESUMO

Em ambientes naturais e agrícolas, as plantas geneticamente modificadas e seus transgenes estabelecem contato com espécies não alvo que desempenham importantes funções ecológicas. Os estudos revelam que a eficiência de plantas geneticamente modificadas para controlar pragas é bem conhecida; no entanto, seus efeitos letais e/ou sub-letais sobre insetos não-alvo, permanecem em discussão. O conhecimento sobre o impacto das plantas transgênicas em insetos não alvo, como as abelhas, a campo ainda é escasso. Neste contexto buscou-se avaliar o efeito do pólen de plantas de milho geneticamente modificado sobre o desenvolvimento das áreas de cria, caracteres morfológicos e comportamento higiênico de abelhas africanizadas em condições de campo; e determinar a ocorrência de proteínas transgênicas no mel produzido em Santa Catarina, através do uso de tiras imunocromatográficas de detecção de proteínas transgênicas. Os resultados mostraram que o pólen transgênico dos cultivares de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 Cry2Ab2 e Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS causaram aumento na área de desenvolvimento de crias aberta e redução na área de desenvolvimento de crias operculada; redução no peso de pupas e diminuição gradativa da taxa de comportamento higiênico. Em relação ao teste de detecção imunocromatográfica através de tiras em mel, este mostrou-se eficiente para detecção da presença das proteínas transgênicas, e do total de amostras de mel analisadas, seis amostras responderam positivamente para todos os transgenes avaliados: Cry 1Ab, Cry 1F e RR; comprovando que as abelhas forrageiam em plantas transgênicas.

**Palavras chave:** *Apis mellifera*, abelha, proteína Cry.



## ABSTRACT

In natural and agricultural environments, genetically modified plants and their transgenes establish contact with non-target species that perform important ecological functions. Studies show that the efficiency of genetically modified plants to control pests is well known; however, its lethal and / or sub-lethal effects on non-target insects remain under discussion. Knowledge about the impact of transgenic plants on non-target insects, such as bees, on the field is still scarce. The objective of this study was to evaluate the effect of pollen from genetically modified corn plants on the development of breeding areas, morphological characters and hygienic behavior of africanized bees under field conditions; and to determine the occurrence of transgenic proteins in the honey produced in Santa Catarina, through the use of immunochromatographic strips of detection of transgenic proteins. The results showed that transgenic pollen from maize cultivars expressing the Cry1A.105 Cry2Ab2 and Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS proteins caused an increase in the area of open hatchlings development and reduction in the area of hatchlings development; reduction in pupal weight and gradual decrease in the rate of hygienic behavior. In relation to the immunochromatographic detection test by means of honeycomb strips, it was efficient to detect the presence of the transgenic proteins, and of the total honey samples analyzed, six samples responded positively to all the evaluated transgenes: Cry 1Ab, Cry 1F And RR; proving that bees forage in transgenic plants.

**Key words:** *Apis mellifera*, bee, protein Cry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de vida das abelhas <i>A. mellifera</i> . .....	30
Figura 2. Vista geral da Fazenda Ressacada, pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina, onde efetuou-se a semeadura dos cultivares híbridos de milho, transgênicos e convencional. Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014.....	39
Figura 3. Semeadura dos eventos de milho para coleta de pólen (Fazenda Ressacada – CCA – UFSC). Fazenda da Ressacada, UFSC, Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014.....	40
Figura 4. Plantas de milho, convencional e transgênicos, com inflorescência ensacada para coleta de grãos de pólen. Fazenda da Ressacada, UFSC, Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014. ....	41
Figura 5. Peneira processadora utilizada para separação dos grãos de pólen. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.....	42
Figura 6. Vista geral da Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis – SC, local onde instalou-se o apiário para condução dos estudos. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2011,2012, 2013 e 2014.. ..	43
Figura 7. Avaliação do peso de pupas de <i>Apis mellifera</i> . Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2014. ....	47
Figura 8. Níveis de detecção de proteína Cry encontrados em pólen de milho, utilizando tiras de detecção. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015. ....	51
Figura 9. Esquema de detecção imunocromatográfica para verificação da presença de proteínas transgênicas em amostras de pólen de milho e mel. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis – SC, 2015. ....	54
Figura 10. Detecção imunocromatográfica para verificação da presença de OGM's em amostras de pólen de milho. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2014. ....	55



## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Plantas de milho geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil, utilizadas no presente estudo. ....	23
Tabela 2. Amostras de mel de <i>A. mellifera</i> coletadas para detecção de proteínas transgênicas. Laboratório de Entomologia Agrícola, CCA – UFSC, Florianópolis - SC, 2014. ....	50
Tabela 3. Níveis de detecção de proteínas transgênicas em pólen de milho com o uso de tiras imunocromatográficas. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015. ....	52
Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão (DP) das áreas de cria aberta (ovo e larva) em cm <sup>2</sup> , de abelhas africanizadas, <i>Apis mellifera</i> , submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a agosto de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014. ....	56
Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão (DP) das áreas de cria operculada (fechada) em cm <sup>2</sup> , de abelhas africanizadas, <i>Apis mellifera</i> , submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a agosto de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014. ....	57
Tabela 6. Comportamento Higiênico de <i>Apis mellifera</i> submetidas a dietas contendo pólen de milho transgênico e convencional, durante os períodos de outubro de 2013 a julho de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014. ....	63
Tabela 7. Detecção de proteínas transgênicas em amostras de mel através do método de tiras imunocromatográficas. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015. ....	66
Gráfico 1. Áreas de cria aberta e operculada em percentagem, encontradas nos cinco tratamentos testados. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014. ....	58
Gráfico 2. Peso médio, em gramas, de pupas de <i>Apis mellifera</i> alimentadas com pólen de milho convencional, eventos transgênicos (VT PRO e VT PRO2), PTS + ELC, e florada disponível. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014. ....	61





## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS .....	15
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	19
2. HIPÓTESES DE PESQUISA .....	35
3. OBJETIVOS .....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.1. Semeadura de plantas de milho convencional e transgênico para coleta de grãos de pólen .....	39
4.2. Localização e instalação do apiário experimental .....	42
4.3. Fornecimento de dieta artificial com pólen de milhos transgênicos e convencional.....	43
4.4 Parâmetros analisados .....	46
4.4.1 Desenvolvimento das áreas de cria .....	46
4.4.2 Avaliação do peso de pupas de <i>Apis mellifera</i> .....	47
4.4.3 Avaliação do comportamento higiênico .....	48
4.5 Coleta e análise de mel.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1 Detecção imunocromatográfica da presença das proteínas Cry nos eventos de milho utilizados.....	55
5.2 Avaliação do desenvolvimento das áreas de crias .....	56
5.3 Avaliação do peso de pupas de <i>Apis mellifera</i> .....	60
5.4 Avaliação do comportamento higiênico .....	62
5.5 Análise de mel provenientes de colmeias de <i>Apis mellifera</i> da região oeste catarinense .....	65
6. CONCLUSÕES.....	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	73
REFERÊNCIAS .....	75
ANEXOS .....	93



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os avanços ocorridos na área da engenharia genética tem mudado o modo de manuseio dos genes de espécies domesticadas, possibilitando incorporar traços e características, em plantas e animais, em condições e rapidez até então desconhecidas. Dentre estes avanços destacam-se os organismos geneticamente modificados (OGM's), definidos como organismos vivos (plantas, animais ou microrganismos), cujo material genético foi alterado por meio de engenharia genética, seja pela introdução de sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico) e ou RNA (ácido ribonucleico) exógenas, que podem ser originárias de qualquer organismo vivo, inclusive de organismos filogeneticamente distantes à espécie a ser modificada (TOZZINI, 2004), seja pela inativação de genes endógenos (TERADA et al., 2002).

Estes avanços estabelecem novos domínios em todas as áreas do conhecimento, singularmente no melhoramento genético de plantas, pois permite a transferência de genes específicos, de espécie para espécie, não importando a relação entre os organismos. A transferência (introdução) de um ou vários genes em um organismo sem que haja a fecundação ou o cruzamento é denominada transformação genética.

Os organismos modificados geneticamente recebem o nome de transgênicos e os genes inseridos são denominados de transgenes (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Nodari e Guerra (2001) citam que a transformação genética de plantas consiste na inserção no seu genoma de uma ou mais sequências, geralmente isoladas de mais de uma espécie, especialmente arranjadas de forma a garantir a expressão gênica de um ou mais genes de interesse. Para os autores, neste contexto o prefixo trans era plenamente justificado, pois expressava a ideia de “além de”, neste caso, significando o rompimento da barreira da espécie. Segundo Varzakas; Arvanitoyannis; Baltas (2007) os organismos geneticamente modificados podem ser definidos como organismos cujo material genético (DNA) foi alterado de modo artificial. A tecnologia geralmente é denominada biotecnologia moderna ou tecnologia genética, ou também, tecnologia de DNA recombinante, ou ainda, engenharia genética. Nesta técnica transferem-se genes selecionados individualmente de um organismo a outro, também entre espécies não relacionadas. Tais métodos são utilizados para se criar plantas

geneticamente modificadas, que são então usadas para cultivar alimentos geneticamente modificados.

A manipulação do DNA/RNA através de várias técnicas e a transferência de um organismo para outro (técnica do DNA/RNA recombinante), tem permitido a introdução de características de quase todo organismo para uma planta, bactéria, vírus, ou animal. Tais organismos transgênicos são programados para a fabricação em massa de várias substâncias, tais como, enzimas, anticorpos monoclonais, nutrientes, hormônios e vários produtos farmacêuticos incluindo drogas e vacinas (BROWN, 1996; CAMPBELL, 1996). Com o estabelecimento de normas gerais de biossegurança, é que se começou a utilizar a expressão organismo geneticamente modificado (OGM).

No Brasil, de acordo com a Lei N. 11.105, de 24 de março de 2005, organismos geneticamente modificados são definidos como toda entidade biológica cujo material genético (DNA/RNA) foi alterado por meio de qualquer técnica de engenharia genética, de uma maneira que não ocorreria naturalmente (BRASIL, 2005). A tecnologia permite que genes individuais selecionados sejam transferidos de um organismo para outro, inclusive entre espécies não relacionadas. Estes métodos são usados para criar plantas geneticamente modificadas para o cultivo de matérias-primas e alimentos.

De acordo com Conceição; Moreira; Binsfeld (2004) o conhecimento da estrutura básica de um OGM é importante para compreender o princípio de alguns métodos utilizados na detecção destes organismos. Um típico inserto de um OGM é composto por três elementos: o promotor, que regula a leitura do gene (transcrição); o gene de interesse, que determina a característica desejável; e o elemento terminador, responsável pelo término da transcrição. Conceição; Moreira; Binsfeld (2006) citam que além destas, outras sequências exógenas de DNA, responsáveis principalmente pela regulação e estabilização do gene inserido, podem estar eventualmente presentes. A combinação de todos estes elementos caracteriza um evento, ou seja, a construção gênica característica de um OGM.

Para Konig et al. (2004) as plantas geneticamente modificadas e seus produtos derivados destinados à alimentação, tem sido modificados por meio da inserção de genes, os quais expressam características tais como tolerância à herbicidas e/ou resistência a insetos.

No Brasil a adoção da tecnologia de plantas transgênicas aconteceu de forma rápida e efetiva, especialmente por parte dos

agricultores. Estima-se que a área plantada com a tecnologia para as principais culturas relativas ao agronegócio brasileiro (soja, milho e algodão) alcançaram na safra 2014/2015 aproximadamente 42,5 milhões de hectares, sendo que a área total de grãos no país está estimada em 47,76 milhões de hectares.

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, e é matéria prima para produção de diversos produtos, especialmente na alimentação animal. Estima-se que do total da safra brasileira de milho 2014/15, a área semeada com cultivares transgênicos foi de 12,5 milhões de hectares ou 82,7% da área total.

As plantas de milho geneticamente modificadas resistentes a alguns insetos pragas, expressam genes de toxinas (genes *Bt*) das variedades da bactéria *Bacillus thuringiensis* (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Essas bactérias produzem proteínas cristais (Cry), conhecidas como delta-endotoxinas, que possuem certa especificidade para algumas ordens de insetos ou outros organismos do solo (nematóides, por exemplo).

Crickmore et al. (2014) citam que as proteínas Cry são classificadas pela sua sequência primária de aminoácidos, e mais de 700 sequências diferentes do gene Cry já foram classificadas em 72 grupos (Cry1-Cry 72), a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Dessa maneira, o milho *Bt* adquire resistência a insetos pragas, que ao ingerirem as folhas de milho transgênico se intoxicam e morrem. As pró-toxinas, quando ingeridas, são solubilizadas pelo pH alcalino do trato intestinal do inseto-alvo e clivadas pelas proteases intestinais, tornam-se peptídeos de menor tamanho. Estes são colhidos por receptores específicos encontrados no epitélio e iniciam um processo de destruição tecidual, que colabora para a paralisação muscular, levando o inseto à morte. O gene introduzido codifica a expressão de proteínas *Bt*, com ação inseticida no controle de lepidópteros como por exemplo, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Helicoverpa zea*.

Lourenção; Barros; Melo (2009) citam que a expressão da toxina pode variar de acordo com a parte da planta observada e com o híbrido. Os níveis de expressão da proteína Cry1Ab na linhagem MON810 foram avaliados em folhas jovens, grãos, planta toda e pólen. Os resultados observados evidenciaram os maiores níveis de expressão nas folhas (9,35 µg/g de peso seco), seguidos pela planta toda (4,31 µg/g de peso seco), grãos (0,31 µg/g de peso seco) e pólen (0,09 µg/g de peso seco).

No Brasil, as primeiras pesquisas com plantas de milho geneticamente modificadas, que expressam proteínas inseticidas (Cry) provenientes da bactéria *B. thuringiensis*, iniciaram em 1997, com o milho *Bt11* (SYNGENTA, 2010). Híbridos de milho expressando a proteína Cry1Ab foram aprovados em 2007 e cultivados comercialmente em 2008 (derivados das linhagens MON810 e *Bt11*) (MENEZES *et al.*, 2011).

Para a safra 2014/2015, o mercado brasileiro disponibilizou 478 cultivares de milho, sendo 292 cultivares transgênicas e 186 cultivares convencionais. Estes cultivares transgênicos são resistentes a insetos da ordem lepidóptera e/ou com resistência a herbicidas (CRUZ; PEREIRA FILHO; SIMÃO, 2014).

Plantas de milho que expressam proteínas inseticidas (Cry) provenientes da bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*) são consideradas plantas de primeira geração. No entanto, existem plantas que são modificadas geneticamente com dois ou mais genes inseticidas e estas são designadas plantas de segunda geração. Desta forma, quando os transgenes são direcionados para o controle do mesmo inseto-alvo, sendo cada um tóxico por si só, o evento é denominado “piramidado” e quando os dois transgenes são independentes e não atuam sobre o mesmo organismo-alvo, o evento é denominado “estaqueado”.

A Tabela 1 apresenta as plantas de milho geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no país, utilizadas no presente estudo, e no Anexo 1 disponibiliza-se o resumo geral de plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil, atualizado em 15/06/2015, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Em 2009 a CTNBio aprovou a comercialização de plantas de milho geneticamente modificadas expressando duas proteínas inseticidas: Cry1A.105 e Cry2Ab2, denominada evento piramidado MON 89034 (Tabela 1). Conforme Moar & Anilkumar (2007), avanços na área de biotecnologia têm permitido o desenvolvimento de milhos *Bt* que expressam mais de uma proteína inseticida frequentemente com modos de ação únicos e independentes. Com isso, caso essas premissas sejam atendidas, a piramidação de genes *Bt* pode retardar o estabelecimento de populações de insetos resistentes (HEAD & GREENPLATE, 2012). Para Storer; Thompson; Head (2012) a

estratégia de piramidação de genes *Bt* é caracterizada por aumento no nível de proteção da planta *Bt* contra as pragas-alvo.

**Tabela 1.** Plantas de milho geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil, utilizadas no presente estudo.

Nome comercial	Eventos	Organismo doador	Características	Proteína	Ano de aprovação
PRO	MON 89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2	<b>2009</b>
PRO2	MON 89034 7 NK 603	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	<b>2010</b>

Fonte: Compilado a partir do Resumo Geral de Plantas Geneticamente Modificadas aprovadas para Comercialização, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, disponível em [http://www.ctnbio.gov.br/upd\\_blob/0002/2086.pdf](http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0002/2086.pdf)

O evento piramidado MON 89034 foi desenvolvido a partir da combinação de genes que codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em um único vetor de transformação genética de plantas. Trata-se, portanto, da introdução em plantas de milho dos genes que codificam estas duas proteínas tóxicas (Cry1A.105 e Cry2Ab2) que são específicas para lepidópteros-praga (Lee et al., 2003) que atacam a cultura. A reunião de duas proteínas *Bt* foi concebida para ampliar a antibiose contra insetos-praga e melhor manejo da resistência às mesmas, podendo quando combinadas retardar a evolução da resistência em populações de insetos, em condições de campo (NOBREGA, 2009; LEITE et al., 2011), e aumentar o espectro de ação da planta *Bt* (MANYANGARIRWA et al., 2006). A proteína Cry1A.105 resulta da expressão do gene *cry1A.105* que é uma construção quimérica dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1F* e a proteína Cry2Ab é uma variante da proteína selvagem, sendo ambas derivadas de *B. thuringiensis* (ZHUANG & GILL, 2003).

O evento estaqueado MON 89034 7 NK 603 expressa duas proteínas inseticidas e uma proteína que permite tolerância ao herbicida

glifosato. O parental MON 89034 possui os cassetes de expressão dos genes *cryIA.105* e *cry2Ab2* (derivados de *B. thuringiensis*), que codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, respectivamente, responsáveis por conferir resistência a insetos. As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 se ligam a esses receptores localizados no intestino médio de insetos suscetíveis, levando à formação de poros que causam a morte do inseto (TAYLOR et al., 2005). O parental de milho NK 603 contém dois cassetes de expressão do gene *cp4 epsps* (derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4), com suas respectivas sequências regulatórias. O gene *cp4 epsps* codifica a proteína 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS), que confere tolerância à ação do herbicida glifosato.

Fontes & Mello (1999) citam que para uma planta transgênica ser considerada efetivamente uma tecnologia e possa integrar-se aos sistemas produtivos, há necessidade de que ela não apresente riscos à saúde e ao meio ambiente, sendo esta uma condição essencial para uma comercialização sem restrições. De acordo com os autores, existe uma constante preocupação com relação ao impacto das plantas transgênicas no meio ambiente, uma vez que os resultados das interações entre os organismos geneticamente modificados e o meio ambiente não podem ser sempre previstos. De acordo com Tiedje *et al.* (1989); Teixeira & Valle (1996); Nodari & Guerra (2001); Traavik & Ching (2007), o cultivo dos OGM's em larga escala traz novos e imprevisíveis riscos à segurança alimentar e ambiental.

Em ambientes naturais e agrícolas, as plantas geneticamente modificadas e seus transgenes estabelecem contato com espécies não alvo que desempenham importantes funções ecológicas. Estas espécies tem sido definidas como aquelas que não são propósito direto do uso de um transgene particular. Os estudos revelam que a eficiência de plantas geneticamente modificadas para controlar pragas é bem conhecida; no entanto, seus efeitos letais e/ou sub-letais sobre insetos não-alvo, permanecem em discussão. O conhecimento sobre o impacto das plantas transgênicas em insetos não alvo, como por exemplo, as abelhas, ainda é escasso.

O papel ecológico das abelhas é fundamental na manutenção da diversidade de espécies vegetais. As abelhas tem importância biológica não só como polinizadores, também elas ou seus produtos são parte da teia trófica. Além disso, possuem importância econômica por seus produtos apícolas ou de serviços de polinização de plantas cultivadas.



Portanto, conhecer antecipadamente os efeitos de plantas transgênicas sobre as abelhas é uma observância ao princípio da precaução.

Abelhas em geral podem ser expostas aos produtos transgenes via pólen ou néctar. As toxinas produzidas em plantas transgênicas são proteínas que ainda não foram detectadas em néctar, o que corrobora que os riscos potenciais para as abelhas devido aos produtos transgenes muito provavelmente sejam devido à alimentação por pólen. Como as abelhas são incapazes de distinguir flores transgênicas de não transgênicas (MALONE & PHAM-DELÈGUE, 2001; HUANG *et al.*, 2004), as colônias de abelhas têm sido confrontadas cada vez com maior quantidade de pólen, contendo proteínas novas e estranhas ao ambiente da colônia.

Segundo Craig *et al.* (2008) dois tipos de riscos podem ocorrer em consequência da liberação de OGM's no ambiente: (1) efeitos inesperados na população-alvo, por exemplo, a evolução da resistência de pragas alvo/populações do patógeno quando o transgene confere resistência a uma praga ou patógeno; e (2) efeitos inesperados nas populações não-alvo, por exemplo, alterações na biodiversidade local associada direta ou indiretamente com a planta transgênica, ou aqueles associados com a integração e posterior expressão do transgene individual em um organismo diferente (fluxo gênico). Importante destacar também entre os riscos não citados: a possibilidade de expressão de novas sequências e novas substâncias, a transferência de genes a outras espécies e a ineficiência de produtos microbianos.

Por conta da sua importância econômica, e considerando que se alimentam de grandes quantidades de pólen, inclusive de milhos *Bt* (SABUGOSA-MADEIRA *et al.*, 2007), os polinizadores como *Apis mellifera* merecem especial destaque na avaliação de risco.

Em *A. mellifera*, o pólen é um alimento importante para as larvas e abelhas jovens após a emergência (HAYDAK, 1970). Masson & Arnold (1984), Masson *et al.* (1993), explicam que enquanto as larvas ou jovens adultos de abelhas são alimentados com pólen, ocorre o desenvolvimento de estruturas fisiológicas envolvidas no olfato e desempenhos de aprendizagem, portanto, os efeitos das proteínas Cry sobre estes processos merecem atenção.

Babendreier *et al.* (2005), relatam que toxinas *Bt* foram encontradas nas glândulas hipofaríngeas de jovens abelhas melíferas alimentadas com alimento contaminado *Bt*. não causaram efeitos no desenvolvimento da glândula, mas o estudo mostrou que toxinas *Bt*

podem acumular nos tecidos de abelhas. Para Ramirez-Romero *et al.* (2008), a exposição de abelhas jovens a toxinas *Bt* pode causar efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e desempenho de aprendizagem. Aprendizagem é de fundamental importância no forrageamento de abelha melífera (WINSTON, 1987), por isso qualquer prejuízo indireto e/ou direto nessa capacidade, pode afetar o desenvolvimento de colônias de abelhas e seu papel como polinizadores em culturas agrícolas (RAMIREZ-ROMERO *et al.*, 2008).

O estudo de Kaatz (2005) revelou que as abelhas alimentadas com pólen de milho *Bt* mostraram-se mais susceptíveis à uma infecção parasitária de microsporídeo. Assim, o autor do estudo conclui que a diferença significativa (entre as colônias alimentadas com pólen de milho *Bt* e aquelas alimentadas com pólen convencional) indica uma interação da toxina e do patógeno nas células epiteliais do canal alimentar das abelhas, de mecanismo de ação desconhecido. O estudo de Ramirez-Romero *et al.* (2008), revelam que abelhas alimentadas com pólen de milho *Bt* podem ser afetadas no comportamento de associação das fontes de néctar com moléculas odoríferas. Cabe ressaltar que tais modificações comportamentais de abelhas já foram observadas no caso das abelhas alimentadas com pólen tratado com o inseticida imidacloprid (DECOURTYE *et al.*, 2004). Assim, as abelhas alimentadas com pólen de milho *Bt* continuam a aprender odores mesmo se não se concretiza com acesso à alimentação, enquanto as abelhas alimentadas com pólen convencional irão procurar outras fontes de alimentação (RAMIREZ-ROMERO *et al.*, 2008).

A planta de milho não é considerada uma espécie melífera, porém, pode ser utilizada pelas abelhas como fonte de pólen, especialmente em períodos do ano em que são escassas as plantas em floração, sendo considerada por essa razão um alimento estratégico. Portanto, os resultados anteriormente citados parecem ser reveladores da exposição que as abelhas e também os seus produtos (especialmente o mel) estão sendo submetidos.

Nas últimas décadas tem sido observado um declínio acentuado de polinizadores em todo o mundo. Este fenômeno tem sido denominado “declínio dos polinizadores”. Na Europa, o declínio de colmeias de abelhas, tanto domésticas, quanto nativas, tem sido evidenciado nos últimos anos (ORTH & MATOS, 2000). De acordo com Spivak (2008) nos Estados Unidos, foi perdida aproximadamente um milhão de colônias de abelhas nos invernos de 2006 e de 2007. Trata-se

de um conjunto de sintomas chamado “Colony Collapse Disorder” (CCD), cujas causas estão sendo investigadas através dos órgãos oficiais da Agriculture Research Service (ARS) e do United States Department of Agriculture (USDA). O impacto tem sido tão preocupante que em abril de 2007, o ARS realizou um Workshop reunindo cerca de 80 pesquisadores da área, representantes da indústria e agentes de extensão, com a finalidade de discutir um plano de ação denominado “Colony Collapse Disorder Action Plan” para pesquisar as causas do fenômeno (PINTO & MIGUEL, 2008).

Nenhuma causa definitiva para a Desordem do Colapso de Colônias (CCD) foi até o presente estabelecida, mas há um consenso generalizado de que seja causada pela combinação de um conjunto de fatores (OLDROYD, 2007). Esta combinação de fatores inclui: novas doenças, parasitoses, genética, nutrição, pesticidas agrícolas e alterações nos agroecossistemas (DE JONG & MESSAGE, 2008; SPIVAK, 2008).

As plantas transgênicas tem sido um dos fatores especulados para este declínio, especificamente porque as proteínas Cry são toxinas ativas para insetos, e as abelhas são expostas a estas através de diversas rotas. Em particular, as larvas de abelha, uma vez que consomem grandes quantidades de pólen, por vezes, a partir de plantas de milho (SABUGOSA-MADEIRA *et al.*, 2007).

No Brasil, a mortalidade súbita de abelhas têm sido observada por apicultores de diversas regiões do país, como Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Existem relatos de casos com perda de 400 colônias, mas na maioria dos casos não foram coletadas amostras para análise e comprovação da contaminação (MALASPINA *et al.*, 2008). Os apicultores e técnicos apícolas do Estado de Santa Catarina têm mostrado preocupação quanto à ocorrência do “desaparecimento das abelhas”. Com a intensa divulgação do fenômeno CCD na mídia a partir de 2007, o Centro de Pesquisa e Extensão Apícola (EPAGRI/CEPEA) recebeu inúmeros chamados por parte de produtores e técnicos, que relataram casos de mortalidade e desaparecimento de abelhas (PINTO & MIGUEL, 2008). Ninni (2011) relata a perda de colmeias no Estado de Santa Catarina, onde há uma dependência do inseto para a realização da polinização dirigida em pomares de macieiras, chegando a dezenas de milhares de colmeias movimentadas para essa finalidade. Em 2011, em virtude de perda de colmeias, o valor do aluguel para a execução dos serviços de polinização em pomares de macieiras chegou a R\$

75,00/colmeia, contrastando com o valor normalmente executado de R\$ 45,00/colmeia.

As abelhas formam o grupo mais importante dos visitantes florais, sendo responsáveis pela polinização de mais flores que qualquer outro animal. As famílias modernas de abelhas existem há cerca de 80 milhões de anos. Tal como outros insetos, as abelhas aprendem a reconhecer cores, odores e formas. As abelhas solitárias, que são a maioria das espécies, visitam um número restrito de plantas, o que aumenta a eficiência de todo o processo polinizador. As abelhas mais fiéis têm geralmente adaptações morfológicas ao tipo de flor visitada e que, por sua vez, é uma força evolutiva importante para a modelação da flor (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004).

O papel ecológico das abelhas é fundamental na manutenção da diversidade de espécies vegetais, pois, são essenciais para a reprodução sexual das plantas. Durante suas visitas às flores, as abelhas transferem o pólen de uma flor para outra, promovendo a polinização cruzada, ou seja, a troca de gametas entre as plantas. A polinização para um visitante floral é um produto secundário da coleta de um recurso alimentar, mas para a planta é uma maneira de aumentar ao máximo o fluxo de genes (VITALI *et al.*, 1995). Uma boa polinização garante a variabilidade genética dos vegetais e a formação de bons frutos. Deste modo, as abelhas também são importantes para as plantas cultivadas que dependem de agentes polinizadores. Portanto, as abelhas são diretamente responsáveis pela produção de alimentos: frutas, legumes e grãos (MATEUS, 1998).

Estima-se que no mundo existam mais de 20 mil espécies de abelhas (MICHENER, 2007; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2004), dispersas em todas as partes. A grande maioria destas espécies são solitárias e não produzem ninhos com grandes populações de indivíduos (BUCHMANN & REPPLIER, 2005). Um dos gêneros bem conhecido é *Apis*, composto por oito espécies, e *A. mellifera* com 24 subespécies. O Brasil, devido a suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado neste aspecto, pois abriga cerca de um quarto destas espécies. Só no Estado de São Paulo foram listadas 729 espécies e no Rio Grande do Sul mais de 500 espécies são conhecidas. Segundo levantamentos feitos em diferentes regiões do país, existem mais de duas mil espécies de abelhas catalogadas. Uma ampla diversidade de formas, tamanhos e cores caracteriza a apifauna brasileira. Contudo, a abelha mais conhecida entre

os brasileiros é a abelha européia *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE), que na verdade não é nativa do Brasil. Esta espécie foi introduzida no período colonial para fins de apicultura (SANTOS, 2002).

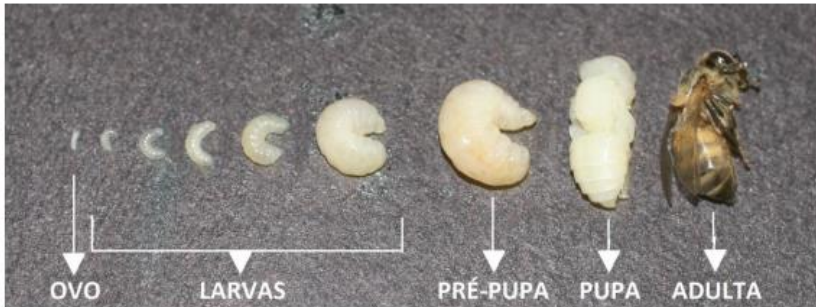
Segundo Gonçalves (2006), no Brasil inicialmente após a introdução de raças de *A. mellifera* oriundas da Europa, no ano de 1956 foram trazidas ao território nacional abelhas *A. mellifera scutellata* Lapeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae), naturais do continente africano. A apicultura brasileira sofreu amplas modificações com a introdução desta abelha africana.

O acasalamento natural dessas abelhas com as abelhas europeias, previamente introduzidas no país, gerou um polihíbrido, resultante de cruzamentos contínuos entre várias raças ou subespécies europeias e uma única subespécie africana, produzindo abelhas com características genéticas com cerca de 70% abelhas africanas e 30% abelhas europeias (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). Este polihíbrido foi denominado abelha africanizada, com predominância de características das abelhas africanas, tais como a tendência para enxamear e a rusticidade (KERR, 1967).

Segundo Gonçalves (2006), no território nacional as abelhas com ferrão criadas em colmeias racionais são abelhas polihíbridas africanizadas, resultantes dos acasalamentos naturais das abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) com as demais abelhas melíferas também importadas anteriormente, as alemãs (*A. mellifera mellifera*, L. 1758), as italianas (*A. mellifera ligustica*, Spinola, 1806) e as carníolas (*A. mellifera carnica*, Pollmann, 1879).

Sanford (2006), cita entre os atributos mais importantes da abelha africanizada do Brasil: aumento do comportamento higiênico; mais eficiente forrageio; maior resistência natural contra pragas e doenças; polinização superior em áreas intensamente cultivadas; predominância genética mais forte; aumento do comportamento defensivo e enxameação.

*A. mellifera* possui as colônias mais populosas das abelhas africanizadas, com cinco fases diferentes de vida: ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto (Figura 1).



**Figura 1.** Fases de vida das abelhas *A. mellifera*. Fonte: material coletado no Apiário localizado na Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis- SC, e elaborado por Mayara Martins Cardozo, outubro de 2014.

Em *A. mellifera* as próprias abelhas realizam um controle sanitário da colônia contra agentes infecciosos causadores de doenças de crias e sem o uso de produtos químicos.

A limpeza da colônia, atividade denominada comportamento higiênico (CH), é realizada pelas abelhas que detectam as células que possuem crias doentes ou mortas, efetuam o processo de desoperculação das células afetadas e na sequência removem a cria para fora da colmeia antes que o vetor alcance o estágio infeccioso, evitando que a doença seja transmitida para toda a colônia (PARK et al., 1937; WOODROW & HOLST, 1942; ROTHENBUHLER, 1964). Gramacho, 1995, 1999; Spivak & Reuter, 2001, inferem que o comportamento higiênico realizado pelas abelhas no interior dos alvéolos nos favos da colônia, é controlado geneticamente.

Segundo Message (1979), o CH pode ser entendido como a remoção de qualquer material estranho no interior da colmeia. Pereira (2008), cita que o comportamento higiênico em *A. mellifera* registrou sua primeira observação na década de 1930, decorrente da tentativa de determinação de resistência por parte das abelhas da colônia à doença Cria Pútrida Americana (causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*), tendo sido observado que algumas abelhas apresentavam um certo grau de resistência às doenças, sendo esta herdável, e que consistia de resistência fisiológica e com componente comportamental. Para Gonçalves & Gramacho (2000) entende-se por colônias higiênicas

aquelas em que suas abelhas removem suas crias doentes ou mortas de suas colônias, eliminando, portanto, o foco infeccioso.

Gramacho (1995), (1999); Gramacho & Gonçalves (1996), consideram o comportamento higiênico como o principal mecanismo de tolerância das abelhas contra pragas e doenças, e um dos principais objetivos a serem alcançados em trabalhos de melhoramento genético de abelhas. A expressão desse comportamento é determinada pelo genótipo das colônias, sendo que abelhas africanizadas possuem maior capacidade de desempenhá-lo do que abelhas de linhagens europeias. Message & Gonçalves (1980), citam que outros fatores externos, como o fluxo e a qualidade do alimento e a idade das abelhas, também podem influenciar a frequência do comportamento higiênico. Conforme Bizzocchi (2014), em estudos analisando o CH de colônias de abelhas *A. mellifera*, submetidas a dietas com e sem pólen transgênico de milho, apesar de todas as colônias terem sido classificadas como higiênicas, alcançando CH maior que 80%, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. As colmeias alimentadas com pólen de milho *Bt* manifestaram a menor taxa de CH. Estes resultados parecem inferir ação das proteínas transgênicas sobre o CH das abelhas, demonstrando assim, impactos adversos em colônias de *A. mellifera*.

O mel é o produto alimentício elaborado pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das mesmas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2001).

É considerado um produto alimentício, composto por uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração (MARCHINI; SODRE; MORETI; 2005).

A composição do mel depende tanto da origem botânica das plantas visitadas pelas abelhas e dos insetos secretores de melato, quanto do clima e das condições ambientais, como umidade relativa do ar, temperatura e luminosidade. A sua utilização ocorre desde os tempos antigos, principalmente como adoçante natural, sendo este produto também muito apreciado pela sua riqueza de sabores e aromas, além de

seu potencial uso terapêutico (LORENTE; CARRETERO; MARTÍN, 2008).

Para a formação do mel ocorrem duas modificações principais no néctar. A primeira modificação é física, pela desidratação, onde a água do néctar evapora na colmeia e na absorção no papo da abelha. A segunda modificação é uma reação química que atua sobre o néctar, transformando a sacarose, através da enzima invertase, em glicose e frutose e em menor escala ocorrem mais duas reações, que consistem em transformar o amido do néctar, através da enzima amilase em maltose e a enzima glicose-oxidase transforma a glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (LEGLER, 2008).

A quantidade de néctar e pólen que pode ser obtido de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de açúcares no néctar e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar (CRANE, 1990).

Nos últimos anos o consumo de mel tem aumentado significativamente no mundo todo, em virtude da busca pelo uso de produtos naturais (BERTOLDI, 2008). Schlabitz; Silva; Souza (2010) inferem que este fator tem impulsionado uma melhoria na qualidade do mel produzido, visando à segurança alimentar através de um produto natural, livre de contaminantes e microrganismos e, assim, a aceitação do mesmo nos mercados internacionais.

Cresce cada vez mais a preocupação das pessoas com a qualidade dos alimentos que consomem, sejam de origem animal ou vegetal. Nesse contexto, o mel também deve satisfazer as exigências do consumidor, possuindo adequado valor nutricional, sabor e aparência característicos, além da garantia de boas condições de higiene e sanidade na colheita, extração e beneficiamento (CAMARGO et al., 2003).

A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, conferindo-lhe características específicas, enquanto que as condições climáticas e o manejo do apicultor têm influência menor sobre essas características (MARCHINI; MORETI; OTSUK, 2005).

No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel disposto na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, apresenta os critérios de qualidade para o mel definidos pelas



características sensoriais (cor, sabor, aroma e consistência) e físico-químicas (teor de açúcares redutores, umidade, sacarose aparente, sólidos solúveis em água, minerais, pólen, acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural), além do Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Mel, que engloba análises de antibióticos e metais pesados (BRASIL, 2001). Apesar de todas estas análises realizadas, o país não possui legislação específica sobre resíduos de proteínas transgênicas para o produto denominado mel.

Diante da problemática exposta, o presente estudo buscou avaliar a influência do pólen de plantas de milho geneticamente modificado sobre o desenvolvimento de *A. mellifera*, e a ocorrência de proteínas transgênicas em mel produzido em Santa Catarina.



## 2. HIPÓTESES DE PESQUISA

Hipótese 1: O pólen de plantas de milho transgênico expressando a proteína Cry pode induzir alterações letais e/ou sub-letais no desenvolvimento de colônias de *Apis mellifera*, tais como: área de desenvolvimento de crias, mortalidade de larvas, caracteres morfológicos de pupas e comportamento higiênico.

H<sub>0</sub>: O pólen de plantas de milho transgênico expressando a proteína Cry não afeta o desenvolvimento de colônias de *Apis mellifera*, tais como: área de desenvolvimento de crias, mortalidade de larvas, caracteres morfológicos de pupas e comportamento higiênico.

H<sub>1</sub>: O pólen de plantas de milho transgênico expressando a proteína Cry afeta negativamente a área de desenvolvimento de crias, causando mortalidade de larvas.

H<sub>2</sub>: O pólen de plantas de milho transgênico expressando a proteína Cry afeta negativamente a área de desenvolvimento de crias, diminuindo o peso de pupas.

H<sub>3</sub>: O comportamento higiênico de abelhas é afetado pela ingestão de dietas contendo pólen de plantas de milho transgênico expressando a proteína Cry.

Hipótese 2: O mel proveniente de ecossistemas com cultivo de plantas transgênicas, cultivares de milho e soja, pode apresentar contaminação com proteínas transgênicas em sua composição, sendo possível detectar esta contaminação com o uso de tiras imunocromatográficas.

H<sub>0</sub>: O mel proveniente de ecossistemas com cultivo de plantas transgênicas (cultivares de milho e soja) não apresenta contaminação com proteínas transgênicas em sua composição.

H<sub>1</sub>: O mel proveniente de ecossistemas com cultivo de plantas transgênicas (cultivares de milho e soja) apresenta contaminação com proteínas transgênicas em sua composição.

H<sub>2</sub>: O uso de tiras imunocromatográficas de detecção de proteínas transgênicas, não consegue detectar nenhum nível de contaminação no mel.

H<sub>3</sub>: O uso de tiras imunocromatográficas de detecção de proteínas transgênicas, permite detectar proteínas transgênicas no mel.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do pólen de plantas de milho geneticamente modificado sobre o desenvolvimento das áreas de cria, caracteres morfológicos e comportamento higiênico de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) em condições de colmeia; e ocorrência de proteínas transgênicas no mel produzido em Santa Catarina, através do uso de tiras imunocromatográficas de detecção de proteínas transgênicas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar o desenvolvimento interno de colônias de abelhas africanizadas submetidas à ingestão de pólen de milho (transgênico e convencional) quantificando a área de cria;
- Avaliar o efeito de ingestão de pólen de milho (transgênico e convencional) sobre a massa corporal de pupas de abelhas africanizadas;
- Analisar o comportamento higiênico em colmeias de abelhas africanizadas submetidas à ingestão de pólen de milho (transgênico e convencional);
- Verificar o uso de tiras imunocromatográficas de detecção de proteínas transgênicas, como ferramenta para detecção da ocorrência de proteínas transgênicas no mel;
- Determinar a ocorrência de proteínas transgênicas no mel produzido na região oeste catarinense em áreas produtoras de cultivares de milho e soja geneticamente modificadas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Semeadura de plantas de milho convencional e transgênico para coleta de grãos de pólen

A semeadura de milho e coleta dos grãos de pólen das plantas foi alocada na Fazenda Experimental da Ressacada (Figura 2) – área sob responsabilidade do Centro de Ciências Agrárias (CCA) pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada na Ilha de Santa Catarina, Bairro da Tapera, ao Sul da Ilha com base nas coordenadas geográficas 27° 41' 06.28" S; 48°32'38.1" O, no município de Florianópolis – SC.



**Figura 2.** Vista geral da Fazenda Ressacada, pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina, onde efetuou-se a semeadura dos cultivares híbridos de milho, transgênicos e convencional. Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014. Fonte: Google Maps (2014).

Efetuou-se em outubro de 2012, fevereiro de 2013 e março de 2014, o preparo e semeadura da área, objetivando a coleta de grãos de pólen.

O experimento foi instalado em uma área de 800 m<sup>2</sup> (40 x 20 m), contando com 18 linhas de 40 metros, com espaçamento de 80 cm entre linhas e 20 cm entre plantas (cinco plantas por metro linear), totalizando 62.500 plantas por hectare. As sementes foram semeadas com semeadora adubadora tratorizada. A adubação foi feita com adubo químico NPK (5-20-20) no ato da semeadura. Durante o experimento, não foi utilizado qualquer tipo de controle fitossanitário.

Utilizou-se sementes dos híbridos comerciais de milho (DKB 240) com tecnologia VT PRO e VT PRO2 (EVENTOS MON89034; MON89034 7 NK603, respectivamente) da empresa Dekalb, que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT PRO) e Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS (VT PRO2), e a respectiva linha isogênica (Figura 3).



**Figura 3.** Semeadura dos eventos de milho para coleta de pólen (Fazenda Ressacada – CCA – UFSC). Fazenda da Ressacada, UFSC, Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014.

As linhas foram integralmente consideradas como área útil para efeito de coleta dos grãos de pólen.



Quando iniciado os procedimentos de coleta de pólen, as inflorescências masculinas (pendões) foram ensacadas com sacos de papel branco encerados no lado interno, e foram fechados na base do pendão com o auxílio de arames, para assim proceder à coleta do pólen (Figura 4).



**Figura 4.** Plantas de milho, convencional e transgênicos, com inflorescência ensacada para coleta de grãos de pólen. Fazenda da Ressacada, UFSC, Florianópolis – SC, 2012, 2013 e 2014.

A cada dois dias das plantas ensacadas, coletou-se o pendão dos sacos de papel, cortando-se a base do pendão e estes eram levados ao Laboratório de Entomologia Agrícola (CCA – UFSC). Os pendões ensacados foram secos em estufa, a uma temperatura de 25 °C por 2 dias.

Após, as panículas foram cortadas em fragmentos de até 5cm, e depositadas em uma máquina processadora de solos, com jogo de quatro peneiras, sendo a última com malha de 90 micrômetros (Figura 5). Ao final o pólen depositado sob a última peneira era coletado em tubos plásticos de 50 ml.

A presença das proteínas no pólen e na amostra da respectiva linha isogênica, foram utilizadas tiras do kit QuickStix da Envirologix para detecção de proteína Cry1A.105.



**Figura 5.** Peneira processadora utilizada para separação dos grãos de pólen. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.

Separou-se 10 g de pólen de cada amostra, sendo estas maceradas em cadinho com auxílio de um pistilo em 100 ml de água destilada. As amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e deixadas em repouso por 1 min. Em seguida foi colocada uma tira por amostra de pólen, realizando a interpretação após 5 min.

Os materiais foram armazenados em temperatura de congelador (-20 °C), no Laboratório de Entomologia Agrícola (CCA – UFSC) até sua utilização.

#### **4.2. Localização e instalação do apiário experimental**

Os núcleos com *A. mellifera*, contendo quatro quadros, foram produzidos no município de Santo Amaro da Imperatriz – SC, por apicultores da região e transportados em dezembro de 2012 á Cidade das Abelhas, localizada em Florianópolis – SC, pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A Cidade das Abelhas (Figura 6), está localizada no bairro Saco Grande, no município de Florianópolis – SC.



**Figura 6.** Vista geral da Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis – SC, local onde instalou-se o apiário para condução dos estudos. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2011,2012, 2013 e 2014. Fonte: Google Maps.

Posteriormente os núcleos foram transferidos para colmeias do tipo Langstroth, sendo inseridos seis favos com cera alveolada para completar os dez necessários. Todas as colônias possuíam rainhas emergidas em dezembro de 2012. Após um período de adaptação foram transferidas para os locais definitivos no apiário experimental da cidade das Abelhas, para a realização dos trabalhos, e quando necessário realizou-se produção de novos núcleos para obtenção de novas colmeias.

### **4.3. Fornecimento de dieta artificial com pólen de milhos transgênicos e convencional**

O experimento constituiu-se dos seguintes tratamentos:

- 1 – Dieta contendo pólen de milho convencional (DKB 240) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% pólen de milho convencional;
- 2 – Dieta contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2;

3 – Dieta contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO2) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS;

4 – Dieta sem pólen de milho – 60% de xarope de açúcar invertido + 20% de proteína texturizada de soja (PTS) + 20% de extrato de levedura de cerveja (ELC);

5 – Dieta Controle – sem fornecimento de alimento artificial, contando apenas com a flora apícola disponível nos arredores do apiário.

O xarope de açúcar invertido (alimentação energética) consistiu dos seguintes ingredientes: 5Kg de açúcar cristal; 1,7 L de água e 5g de ácido tartárico. Este preparado foi cozido em fogo e armazenado em temperatura ambiente, conforme método adaptado de Lengler (2000).

Para a elaboração do tratamento dieta sem pólen de milho, adicionou-se proteína de soja texturizada (PTS) e extrato de levedura de cerveja (ELC), ao xarope invertido previamente preparado. No momento do fornecimento do tratamento adicionou-se 10 gotas de extrato de baunilha, objetivando tornar a dieta atrativa as abelhas.

Para o fornecimento de pólen às colônias, devido a não existência de protocolo experimental, trabalhou-se com base em alguns protocolos que fornecem de 1,5 a 2 mg de pólen para cada larva (HANLEY; HUANG; PETT (2003); HENDRIKSMA; HARTEL; STEFFAN-DEWENTER, 2011). Como o alimento não foi fornecido diretamente às larvas, mas coletado pelas abelhas operárias, o presente estudo foi realizado com a dosagem de 2 mg de pólen por célula de cria. Sabendo-se que cada favo possui 7200 células, determinou-se a quantidade de pólen a ser fornecido por favo através do cálculo: Quantidade de pólen = 7200 (células) x 1 (favo de cria aberta) x 2 (mg de pólen), resultando em 14,40g de pólen por favo colocado na colmeia.

Devido à inexistência de protocolos para fornecimento de dietas transgênicas em colônias de abelhas, elaborou-se, em colaboração com o Dr. James Arruda Salomé, e foi aplicado a seguinte metodologia para fornecimento dos tratamentos as abelhas:

1 – Seleção de favos vazios com células bem construídas (retiradas das colmeias do apiário experimental). Estes favos foram armazenados em ambiente refrigerado (geladeira), e retirados e mantidos em temperatura ambiente vinte e quatro horas antes do momento da utilização;

2 – Seleção de uma colmeia populosa, com pelo menos sete favos cobertos com abelhas operárias e em bom estado sanitário

(BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010), sendo esta denominada de “Colônia Provedora”. Estas receberam durante todo o tempo de condução do experimento alimentação *ad libitum* de xarope de açúcar invertido em alimentador de cobertura;

3 – Abertura da colônia provedora e retirada de favos da área central, para assim, abrir espaço no centro da área de cria. Após esta abertura de espaço, se introduz dois favos com células de cera alveolada selecionados anteriormente. Anota-se a data do procedimento, e calcula-se três dias para que a abelha rainha realize as posturas nestes favos;

4 – Após a postura da rainha (quarto dia) proceder a abertura da colônia provedora e retirar os dois favos com postura, que irão conter ovos de 1, 2 e 3 dias, e larvas de 1 dia;

5 – Os favos retirados da colônia provedora são colocados em uma nova colônia, denominada “Colônia Receptora”, com as seguintes características: populosa, com pelo menos seis favos cobertos e em bom estado sanitário. Estes favos são colocados no centro da área de cria. Acoplada a entrada da colônia receptora é colocado um coletor de pólen a fim de garantir que as abelhas colem apenas o alimento fornecido, impedindo assim a entrada de pólen externo. Após nove dias da introdução dos favos provenientes das colônias provedoras, retira-se o coletor de pólen das colônias receptoras (com exceção do tratamento denominado dieta controle que não recebe o coletor de pólen), voltando ao uso quando da colocação de novos favos;

6 - Os tratamentos fornecidos as abelhas nas colônias receptoras são depositados em alimentador interno, localizado dentro dos ninhos (alimentador Dolittle em plástico injetado), no momento em que recebem os favos provenientes da colônia provedora;

7 – Após 15 dias, a colônia receptora é aberta, retirados os dois favos e realizado o mapeamento da área com cria aberta e operculada.

Ao fim dos mapeamentos, devolveu-se os favos às colmeias receptoras e a partir deste momento contou-se 4 dias para a retirada dos mesmos e colocação dos novos favos, provenientes das colmeias provedoras, nas colmeias receptoras.

Durante a condução do experimento utilizou-se 5 colônias provedoras, que forneciam favos contendo nas células ovos de 1, 2 e 3 dias e larvas de um dia, para cada tratamento testado. Foram usadas 5 colônias receptoras até o final da condução do experimento, que recebiam os favos das colônias provedoras, sendo estes mapeados a cada quinze dias.

A atividade de fornecimento dos tratamentos testados e a determinação do desenvolvimento das áreas com crias dos favos aconteceu no período de 18 de outubro de 2013 a 12 de julho de 2014, permitindo a realização de quinze avaliações por tratamento, sendo neste período avaliados um total de 150 favos.

#### **4.4 Parâmetros analisados**

##### **4.4.1 Desenvolvimento das áreas de cria**

A cada 15 dias realizou-se os mapeamentos das áreas de cria (ovo-larva e pupas de operárias), segundo o método adaptado de ALTIKRITY *et al.* (1971). Os mapeamentos buscaram verificar o desenvolvimento das áreas com cria durante o período experimental.

Em cada tratamento, os dois favos colocados nas colônias receptoras foram analisados em ambos os lados do favo, totalizando assim 4 mapeamentos para cada tratamento.

Com o auxílio de uma folha de acetato transparente, tendo esta a medida de 20 cm de largura x 20 cm de comprimento, delimitada em 100 quadrados com 2 cm de comprimento x 2 cm de altura, totalizando 4 cm<sup>2</sup> de área em cada quadrado, visualizava-se a área a ser mapeada nos favos.

Os resultados visualizados eram anotados em folhas de papel sulfite (com as mesmas delimitações da folha de acetato transparente). Para cada tratamento testado, realizou-se a contagem dos quadriculados que possuíam áreas com cria aberta e fechada (operculada), na área delimitada como área central do favo. As demais células encontradas no quadrado delimitado que não correspondesse a células com cria aberta (ovo ou larva) e cria operculada, como as áreas com alimento (néctar aberto, néctar operculado (mel) e pólen), eram anotadas para serem descontadas da área total.

Posteriormente, terminado os mapeamentos, os resultados eram transferidos para uma tabela onde o número de quadrados encontrados para as variáveis analisadas foram multiplicados por 4 cm<sup>2</sup>.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, e os dados coletados submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando constatada significância, as médias foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados estatísticos foram avaliados através do software estatístico BioEstat 5.0.

#### 4.4.2 Avaliação do peso de pupas de *Apis mellifera*

A fim de verificar se os tratamentos testados, especialmente os que continham pólen convencional e transgênico de milho, proporcionaram alterações morfológicas em abelhas, avaliou-se o peso corporal de *A. mellifera* em fase de pupa de olho rosa. As pupas foram amostradas aleatoriamente dos favos que receberam os cinco tratamentos. De cada favo, em cada tratamento realizado, foram retiradas quinze pupas, sendo este então o tamanho da amostra (n=15). Foram realizadas cinco leituras.

As pupas foram colocadas em placas de Petri e pesadas individualmente, em balança analítica de precisão (0,001g), conforme Figura 7.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e os dados submetidos á análise de variância (ANOVA), e quando constatada significância, as médias foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados estatísticos foram avaliados através do software estatístico BioEstat 5.0.



**Figura 7.** Avaliação do peso de pupas de *Apis mellifera*. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2014.

#### 4.4.3 Avaliação do comportamento higiênico

A avaliação foi realizada conforme metodologia descrita por Newton e Ostasiewski (1986), testado e modificado por Gramacho & Gonçalves (1994).

Em cada tratamento realizado nas colmeias, a cada 13 dias, foi retirado um dos favos de cria operculada de operárias em fase de pupa de olho rosa. Perfurou-se com o auxílio de alfinete entomológico número 2, uma área com 100 células (área A). O alfinete entomológico foi introduzido no centro dos opérculos em uma profundidade que permitisse atingir cada pupa. Uma área vizinha à tratada, contendo cerca de 100 células, foi delimitada para constituir o controle (área B).

Cada área foi demarcada utilizando-se uma folha de acetato transparente, em que também foi registrado o número de células operculadas, desoperculadas parcialmente, pontuadas e as células vazias (a fim de se realizar o ajuste na percentagem).

Após a perfuração, o favo foi devolvido para a colméia de onde foi retirado e, após 24 h, foi realizada a contagem de células vazias tanto na área A como na B (controle).

Utilizou-se o fator de correção “Z” de Moretto (1993), citado por Gonçalves et al., (2008), que corresponde à taxa de limpeza natural do controle, sendo então, calculado e descontado do valor das crias removidas nas áreas tratadas. Assim, o valor estimado para o comportamento higiênico da colônia foi considerado somente quando o valor Z no controle foi igual ou inferior a 10 %, isto é, se não existisse mais de 10 células vazias após 24 horas.

A fórmula de estimativa do fator de correção Z utilizada foi:

$Z = (Y \times 100)/A$ , onde  $Y = C - B$ , sendo,

Z = Porcentagem de células onde a cria operculada foi removida naturalmente no controle;

Y = Número de células onde a cria foi removida naturalmente no controle;

A = Número de células operculadas no controle antes da avaliação;

C = Número de células vazias na área controle após 24 h;

B = Número de células vazias na área controle antes da avaliação.



Para a determinação do comportamento higiênico utilizado para comparar os diferentes tratamentos testados, foi aplicada a fórmula estabelecida por Gramacho & Gonçalves (1994):

$CH = [(CV24h - CV0h) / CO] \times 100 - Z$ , onde:

CV24h = Número de células vazias 24 horas após a perfuração.

CV0h = Número de células vazias antes da perfuração das células operculadas.

CO = Número de células de pupa com olhos cor de rosa antes da perfuração.

Z = Fator de correção obtido do controle.

Foram realizadas dez análises de comportamento higiênico para cada tratamento testado.

A colônia foi considerada higiênica quando as abelhas removeram 80 % ou mais das crias em 24 horas (GRAMACHO & GONÇALVES, 1994).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo teste de tukey a 5%. Os resultados estatísticos foram avaliados através do software estatístico BioEstat 5.0.

#### 4.5 Coleta e análise de mel

As coletas de mel aconteceram no período de setembro de 2013 a setembro de 2014, buscando-se propriedades de apicultores da região oeste catarinense.

Estes apicultores atenderam os seguintes critérios: - Apiário em área com distância aproximada de 3000 m e 1000 m de propriedades rurais que cultivam lavouras de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.) transgênicos, tanto no período da safra, quanto no período conhecido como safrinha. Os apicultores informaram qual era a principal base de pólen constituinte para cada mel coletado (Tabela 2).

Também buscou-se em quatro supermercados do município de Chapecó – SC, todas as marcas comerciais de mel de *A. mellifera* disponíveis à comercialização. Nestes estabelecimentos encontrou-se um total de quatro marcas comerciais.

Oteve-se também no município de Florianópolis – SC, quando da realização da Feira do Mel do ano de 2014, a aquisição de um mel de *A. mellifera* denominado orgânico por certificação participativa,

proveniente do planalto catarinense. Estas cinco marcas comerciais foram incorporadas as amostras.

Estes materiais foram processados pelos apicultores e embalados em amostras de até 2Kg. As quinze amostras foram catalogadas e armazenadas em temperatura ambiente nas dependências do Laboratório de Entomologia Agrícola da UFSC, para posterior análise. A forma de catalogar as amostras obedeceu a sequência de letras maiúsculas do alfabeto romano, a procedência botânica do pólen indicada pelo apicultor e a distância do apiário em relação a área de cultivo de milho. As distâncias de 1000 e 3000 m, receberam as letras A e B, respectivamente. As amostras comerciais foram identificadas utilizando-se a procedência botânica do pólen indicado no rótulo, sendo indicadas pela letra C (Tabela 2).

**Tabela 2.** Amostras de mel de *A. mellifera* coletadas para detecção de proteínas transgênicas. Laboratório de Entomologia Agrícola, CCA – UFSC, Florianópolis - SC, 2014.

<b>Amostras catalogadas</b>	<b>Indicação de procedência botânica</b>	<b>Distância do apiário em relação as culturas (m)</b>
A1	Angico vermelho e Uva do japão	1000
A2	Uva do japão	1000
A3	Eucalipto	1000
A4	Uva do japão	1000
A5	Eucalipto	1000
B1	Eucalipto	3000
B2	Floresta nativa	3000
B3	Uva do japão	3000
B4	Uva do japão	3000
B5	Angico vermelho	3000
C1	Orgânico	*
C2	Florada silvestre	*
C3	Florada silvestre	*
C4	Florada silvestre	*
C5	Eucalipto	*

\*Materiais obtidos em estabelecimentos comerciais.

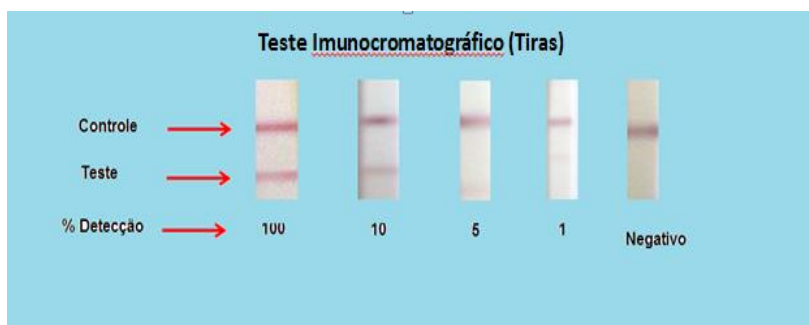
As amostras foram analisadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), Departamento de Fitotecnia, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC.

Tendo em vista que as tiras de detecção foram eficientes para confirmar a presença de proteínas transgênicas no pólen dos milhos coletados para alimentação das colônias de abelhas, buscou-se verificar os limites de detecção alcançados pelas mesmas. Para tal, pesou-se os polens de milhos transgênicos e convencional utilizados neste estudo, em diferentes quantidades, a fim de demonstrar se o teste com fitas consegue detectar a presença de proteínas transgênicas.

Produziu-se amostras contendo um grama, nos níveis 100%, 10%, 5% e 1% para o pólen de milho convencional, polén de milho contendo Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT PRO) e polén de milho contendo Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS (VT PRO2).

Usou-se o produto comercial kit QuickStix da Enviroligix para detecção das proteínas Cry1Ab. O teste foi realizado em triplicatas para cada nível de detecção, totalizando 27 amostras analisadas. A Figura 8 apresenta os níveis de detecção encontrados e os dados das quantidades utilizadas encontram-se demonstrados na Tabela 3. Estes resultados inferem a possibilidade de detecção das proteínas transgênicas em pólenes de milho com níveis até 1%.

Buscando-se verificar a presença das proteínas transgênicas no mel foram utilizadas tiras do kit QuickStix (Enviroligix) para detecção das proteínas Cry1Ab; Cry 1F e CP4-EPSPS em bulk de grãos.



**Figura 8.** Níveis de detecção de proteína Cry encontrados em pólen de milho, utilizando tiras de detecção. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015.

Estas tiras foram escolhidas por serem capazes de detectar proteínas transgênicas para os eventos transgênicos de milho e soja utilizados em cultivares comerciais cultivadas nas áreas adjacentes aos locais de coleta de amostras de mel.

**Tabela 3.** Níveis de detecção de proteínas transgênicas em pólen de milho com o uso de tiras imunocromatográficas. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015.

Nível de detecção (%)	Polén de milho	Quantidade (g)	Resposta da tira a proteína transgênica	
100	Convencional	1	-	
	VT PRO	1	+	
	VT PRO2	1	+	
10	VT PRO	0,1 VT PRO + 0,9 Convencional	+	
		0,1 VT PRO2 + 0,9 Convencional	+	
	VT PRO2	0,1 VT PRO2 + 0,9 Convencional	+	
		0,1 VT PRO2 + 0,9 Convencional	+	
	5	VT PRO	0,05 VT PRO + 0,95 Convencional	+
			0,05 VT PRO2 + 0,95 Convencional	+
VT PRO2		0,05 VT PRO2 + 0,95 Convencional	+	
		0,05 VT PRO2 + 0,95 Convencional	+	
1		VT PRO	0,01 VT PRO + 0,99 Convencional	+
			0,01 VT PRO2 + 0,99 Convencional	+
	VT PRO2	0,01 VT PRO2 + 0,99 Convencional	+	
		0,01 VT PRO2 + 0,99 Convencional	+	

Os cultivos de milho transgênico foram constituídos por cultivares comerciais Herculex e Yield Gard e os cultivos de soja por cultivares comerciais Roundup Ready. Nestas áreas as cultivares de milho foram semeadas para silagem no fim do mês de agosto, as cultivares de soja semeadas no final do mês de outubro e foi realizado o

plântio da safrinha de milho no início de janeiro, para as safras de 2012, 2013 e 2014.

A detecção da proteína resultante da transformação genética por meio da utilização da tira imunocromatográfica baseia-se num complexo de anticorpos ligados a tira que são capazes de reconhecer esta proteína. Anticorpos específicos à proteína são acoplados a um reagente colorido e incorporados na tira do teste. Quando a tira é introduzida em uma fração de extrato que contenha a proteína, forma-se um co-anticorpo que incorporado ao reagente colorido, flui por capilaridade na tira através de uma membrana porosa. A membrana contém duas zonas de captura, uma específica para a proteína alvo e outra para os anticorpos não reagidos (anticorpo de detecção). O anticorpo de detecção, que não se liga à proteína continua a fluir para a parte superior da tira. A presença de apenas uma linha, chamada linha de controle na membrana indica um resultado negativo, enquanto que o aparecimento de duas linhas indica que a amostra é positiva. O resultado neste tipo de teste é observado rapidamente, dentro de 5 a 10 minutos (NASCIMENTO et al., 2012).

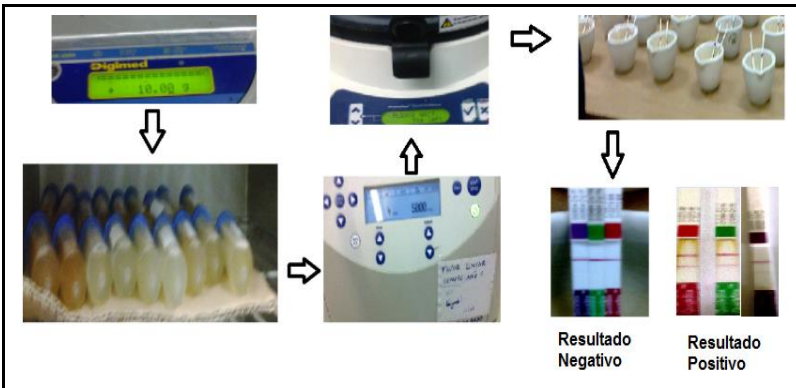
A detecção das proteínas por meio do teste de tiras imunocromatográficas de fluxo lateral em amostras de mel obedeceu a metodologia descrita a seguir (Figura 9).

1. Pesou-se em balança analítica de precisão 10g de mel de cada amostra;
2. Estas foram colocadas em tubos Falcon (50ml), adicionado 40ml de água destilada;
3. Os materiais foram depositados em estufa termostatizada a 65 °C por 30 minutos;
4. Após este período de tempo, foram retirados e colocados em centrífuga (15 minutos em 5000 rpm);
5. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* (sedimento) constituído por detritos sólidos presentes no mel, foi ressuspenso com 200 uL de água;
6. Cada amostra foi transferida para tubos de polipropileno de 2 ml contendo 3 esferas metálicas;
7. As amostras foram homogeneizadas em macerador automático (Precellys) por 2 minutos;
8. As amostras foram transferidas para cadinhos de porcelana, adicionando-se 1 ml de água destilada. Todas as amostras foram extraídas em triplicata, e cada repetição de cada amostra foi avaliada

com três tiras imunocromatográficas para detecção de cada proteína-alvo;

9. Leitura realizada após 5 minutos;

10. Resultados possíveis: tiras que mostraram formação de cor somente na zona controle (uma única banda colorida) foram consideradas negativas para a presença da proteína alvo; tiras que mostraram formação de cor na zona controle e na zona teste (duas bandas coloridas) foram consideradas positivas para a proteína-alvo.



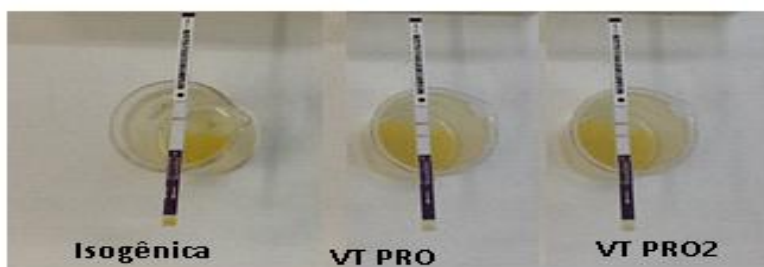
**Figura 9.** Esquema de detecção imunocromatográfica para verificação da presença de proteínas transgênicas em amostras de pólen de milho e mel. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis – SC, 2015.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Detecção imunocromatográfica da presença das proteínas Cry nos eventos de milho utilizados

O teste de tira imunocromatográfico é um método indireto de detecção, porque, por meio dele, a proteína produzida pelo gene e não o gene em si é identificado, e também é um teste no qual geralmente, a presença ou ausência da proteína é identificada.

A Figura 10 apresenta os resultados encontrados para o teste de detecção. Os resultados são lidos do seguinte modo: tira que apresenta apenas uma banda colorida, significa resultado negativo para a presença de OGM, e tira que apresenta duas bandas coloridas, lê-se como resultado positivo para a presença de OGM.



**Figura 10.** Detecção imunocromatográfica para verificação da presença de OGM's em amostras de pólen de milho. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2014.

As tiras do kit QuickStix da Enviroligix utilizadas para detecção de proteína Cry1A.105 confirmaram a presença das proteínas no pólen de milho dos eventos testados, quais sejam: híbridos comerciais de milho (DKB 240) com tecnologia VT PRO e VT PRO2 (EVENTOS MON89034; MON89034 7 NK603, respectivamente) da empresa Dekalb, que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT PRO) e Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS (VT PRO2). A linha isogênica apresentou resultado negativo, demonstrando que não ocorreram misturas de pólenes durante a coleta e/ou processamento das amostras.

Estes resultados garantiram confiabilidade nas dietas fornecidas as abelhas.

## 5.2 Avaliação do desenvolvimento das áreas de crias

Os resultados dos mapeamentos das áreas de crias realizados no período de 18 de outubro de 2013 a 12 de julho de 2014 encontram-se dispostos nos Anexos 2, 3 e 4. Os dados obtidos referem-se às medidas em  $\text{cm}^2$  de favos das áreas de crias abertas (ovo e larva) e crias operculadas (fechadas) de *A. mellifera* analisadas para os cinco tratamentos testados, durante a condução do período experimental.

Nas Tabelas 4 e 5, encontram-se os resultados em  $\text{cm}^2$  dos favos avaliados das áreas de cria aberta e operculada, respectivamente, em cada um dos tratamentos testados.

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) das áreas de cria aberta (ovo e larva) em  $\text{cm}^2$ , de abelhas africanizadas, *Apis mellifera*, submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a agosto de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.

Tratamentos	Médias ( $\text{cm}^2$ )	$\pm$ DP	CV (%)
Pólen milho evento VT PRO	235,33 a*	41,92	17,81
Pólen milho evento VT PRO 2	205,55 a	46,34	22,54
PTS + ELC	97,07 b	40,74	41,98
Pólen milho convencional	95,53 b	31,55	33,02
Florada disponível	114,38 b	57,80	50,54

\* Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Para a variável cria aberta, a análise estatística (ANOVA) demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos avaliados, com  $p < 0.01$  e CV = 29,75% pelo Teste de Tukey a 5%. Para a variável cria operculada, a análise estatística (ANOVA) demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos avaliados, com  $p < 0.01$  e CV = 7,18% pelo Teste de Tukey a 5%.

Os tratamentos que forneceram pólen *Bt* as abelhas para alimentação das larvas apresentaram duas vezes mais área de cria aberta (ovos e larvas) quando comparado aos demais tratamentos onde não foi utilizado pólen *Bt*.



**Tabela 5.** Média  $\pm$  desvio padrão (DP) das áreas de cria operculada (fechada) em cm<sup>2</sup>, de abelhas africanizadas, *Apis mellifera*, submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a agosto de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.

Tratamentos	Médias (cm <sup>2</sup> )	$\pm$ DP	CV (%)
Pólen milho convencional	693,00 a*	31,42	4,53
PTS + ELC	690,49 a	40,31	5,83
Florada disponível	673,88 a	57,83	8,58
Pólen milho evento VT PRO	539,14 b	45,64	8,46
Pólen milho evento VT PRO 2	568,59 b	47,69	8,39

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Tendo em vista que os mapeamentos eram realizados a cada 15 dias, esperava-se de acordo com o ciclo do desenvolvimento do inseto que a área de cria operculada fosse maior que a área de cria aberta. No entanto, estes resultados não se confirmaram para todos os tratamentos testados.

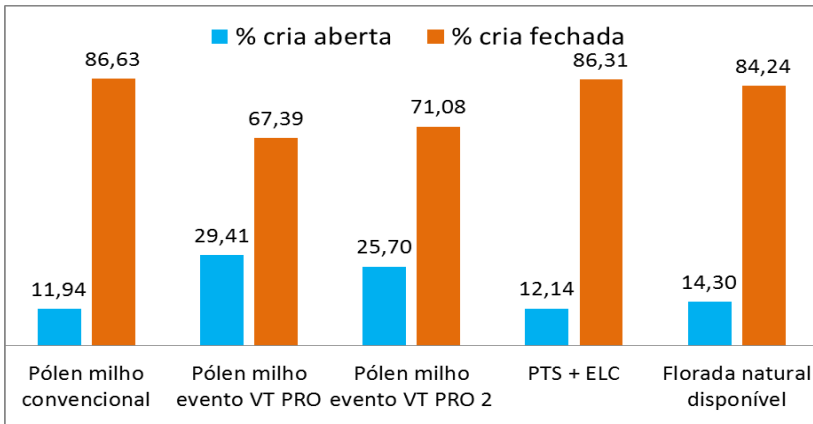
A análise do Gráfico 1, onde os valores de crias aberta e operculada foram transformados em percentagem, confirma que este resultado esperado não aconteceu para os tratamentos contendo os pólenes *Bt*.

Estes resultados encontrados para as áreas de crias abertas e fechadas demonstram que durante o período de alimentação larval houve efeito dos tratamentos que continham o pólen *Bt*, que provocou a mortalidade destas larvas e ou alguma anormalidade que levou as abelhas nutrizas a limpeza das células afetadas e postura das abelhas rainhas. Infere-se, portanto, que as proteínas *Bt* produziram alterações nas colônias avaliadas, reduzindo significativamente a área de cria operculada das mesmas.

Hanley; Huang; Pett (2003), alimentaram as larvas artificialmente com pólen de milho *Bt* na colônia, e encontraram alterações no desenvolvimento dos imaturos, mas não no desenvolvimento das colônias. Arpaia (1996) forneceu às colmeias a toxina Cry3B dissolvida em solução de açúcar e verificou a mortalidade das larvas nos favos. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo. No entanto diferem de trabalhos realizados por alguns autores, que verificaram que o pólen de milho transgênico não influencia no

desenvolvimento das colônias (HANLEY; HUANG; PETT, 2003; HUANG *et al.*, 2004).

**Gráfico 1.** Áreas de cria aberta e operculada em percentagem, encontradas nos cinco tratamentos testados. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.



Ramirez-Romero *et al.* (2008) observaram que tanto larvas como indivíduos adultos de *Apis mellifera* alimentadas com pólen de milho *Bt* apresentaram uma mortalidade superior em relação àquelas alimentadas com pólen de milho não *Bt*, com aumento de 8% para 16%. A partir desses resultados o autor concluiu que o pólen transgênico pode causar impactos no desenvolvimento da colônia. Estudos mostram também que a sobrevivência de abelhas alimentadas com pólen de algodão *Bt* foi afetada (LIU *et al.*, 2000). Kaatz (2005) relatou que as abelhas infectadas com um agente patogênico (*Nosema* sp.) apresentaram valores superiores de mortalidade quando na sua alimentação estava presente pólen de milho transgênico Mon810 e *Bt176*. De acordo com o autor, se as abelhas sãs fossem tratadas com antibióticos, não apresentavam diferente taxa de mortalidade das expostas às toxinas do milho transgênico. Estes resultados levaram o autor a admitir a existência de uma interação da toxina e patógeno sobre o epitélio do intestino das abelhas, tornando-as, assim, muito mais sensíveis à infecção. No entanto, informou que o mecanismo dessa interação é ainda desconhecido.

Em condições normais, as crias alocadas em células próximas umas das outras tem idades semelhantes e, portanto, o mesmo estágio de desenvolvimento larval, apesar de pequenas diferenças temporais poderem ocorrer (WINSTON, 1987). Para Sokol (1996); Heather & Gard (2006), as modificações da composição química do pólen geneticamente modificado pode perturbar o comportamento das abelhas nas colmeias individuais.

Crailsheim et al. (1992); Zerbo; Moraes; Brochetto-Braga (2001); Brodschneider & Crailsheim (2010) inferem que o pólen é essencial para o desenvolvimento de abelhas, uma vez que serve como a sua principal fonte de proteína, inicialmente como alimento das larvas, mas também utilizado ao longo da vida adulta. Por outro lado, as informações sobre os níveis de proteínas recombinantes em pólen raramente é apresentado.

Diferentemente da metodologia proposta no presente procedimento experimental, as avaliações de risco realizadas mundialmente têm sido baseadas em alimentação com proteínas recombinantes purificadas fornecidas *in vitro* para avaliar os efeitos diretos sobre o desenvolvimento das abelhas individuais ou outros insetos (MALONE, 2002; BRODSGAARD et al., 2003; ROMEIS et al., 2011).

Esses experimentos *in vitro* têm demonstrado a segurança ou a equivalência de proteínas recombinantes para as não-recombinantes com base em resultados de curto prazo (LIMA; PIRES; CAMPOS, 2008; ROMEIS et al., 2011). Oportuno destacar que estas avaliações de risco realizadas analisando a alimentação larval de abelhas não conta com a ação das glândulas mandibulares, hipofaringeanas, dentre outras, apesar do fornecimento de geléia real. Segundo Hilbeck & Schmidt (2006) existem vários estudos documentados de efeitos adversos de toxinas e plantas *Bt* sobre diferentes taxons de artrópodes, indicando que as pesquisas publicadas sobre efeitos de plantas *Bt* em espécies não-alvo, em condições de laboratório, são inconsistentes, incoerentes e foram desenvolvidas utilizando metodologias não padronizadas, o que dificulta a interpretação e comparação dos resultados de diferentes trabalhos. Lövei & Arpaia (2005) inferem que muitos testes desenvolvidos em laboratório não apresentaram modelos experimentais adequados e não foram ecologicamente realistas.

É importante ter em vista que além da própria proteína recombinante, os efeitos podem ser causados por metabólitos resultantes

da expressão do transgene, ou por produtos não desejados que são o resultado de interações entre os genes ou pleiotropia (UBERLACKER; KLINGE; WERR, 1996). Além disso, os ensaios *in vitro* de proteínas recombinantes puras diretamente sobre larvas de abelhas *in vitro* ignoram o impacto ecológico sobre a colônia, uma vez que tais ensaios não consideram as interações sociais em colmeias.

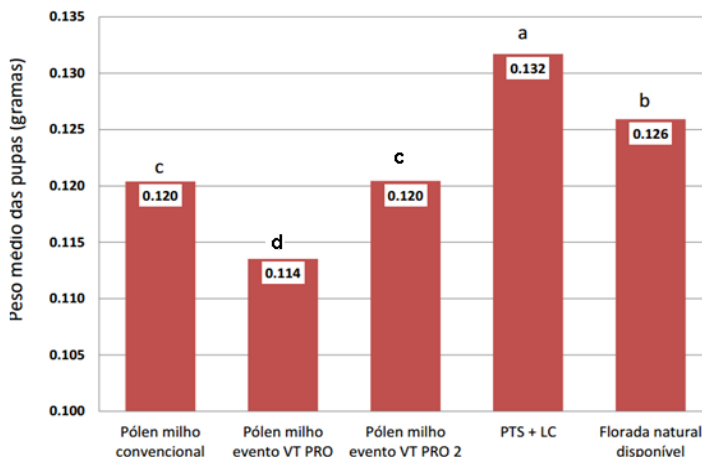
Relevante destacar que fatores nutricionais ou mesmo outras proteínas produzidas pelo milho transgênico, e não pela sua contraparte (linha isogênica) tem sido verificado em diversos estudos, como os de AGAPITO-TENFEN *et al.* (2013); BOHN *et al.* (2014) e HEINEMANN; AGAPITO-TENFEN; CARMAN, (2013). Entretanto, estas novas proteínas ainda não foram suficientemente estudadas em termos de efeitos adversos a organismos não alvos das variedades de plantas transgênicas.

### **5.3 Avaliação do peso de pupas de *Apis mellifera***

A análise de variância (ANOVA) para a variável massa corporal das pupas analisadas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos testados, com  $p < 0.01$  e  $CV = 1.21\%$ .

Conforme a análise do Gráfico 2, pode-se observar que o tratamento contendo proteína texturizada de soja (PTS), extrato de levedura de cerveja (ELC) e o xarope de açúcar invertido, apresentou o melhor resultado para peso de pupas de abelhas *A. mellifera*, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Estes resultados confirmam Lengler (2003), que aponta que a alimentação artificial é de vital importância para o equilíbrio nutricional das abelhas, por possibilitar a redução das perdas das áreas de cria e mel, e promover maiores produções de pólen. Também Haydak (1970); Pereira et al. (2008); Pereira (2009); Salomé (2009), entendem que as dietas mais usadas para fornecer proteínas, são misturas contendo farinha de soja, leite desnatado em pó e levedura de cerveja. Em relação a suplementação energética, para Lengler (2003) e Pereira et al., (2003), entre as fórmulas testadas a de maior aceitação, consumo e palatabilidade para abelhas *A. mellifera* foi o açúcar invertido, inclusive sendo mais bem aceito que o mel.

**Gráfico 2.** Peso médio, em gramas, de pupas de *Apis mellifera* alimentadas com pólen de milho convencional, eventos transgênicos (VT PRO e VT PRO2), PTS + ELC, e florada disponível. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.



O tratamento onde as abelhas dispuseram da florada apícola local, diferiu significativamente dos demais, apresentando peso de pupas inferior ao tratamento contendo a mistura de suplementação energética e proteica. Este resultado corrobora a importância da oferta de alimentação artificial para ajudar a manter a população da colônia sem diminuir a produção na safra seguinte, assegurando a produtividade e os lucros (CASTAGNINO et al., 2006; COELHO et al., 2008; SCHAFASCHEK et al., 2008; SILVA, 2008). Também confirma Silveira (1987); Pereira (2005); Salomé (2009), que citam que o fundamento da exploração apícola é baseado na vegetação existente em uma localidade. Em condições ambientais desfavoráveis, quando há falta ou escassez de alimento no campo, os enxames ficam enfraquecidos (PEREIRA et al., 2003; CASTAGNINO et al., 2004; COELHO et al., 2008; SILVA, 2008) e migram em busca de locais onde os alimentos são mais abundantes, o que compromete a produção de mel da safra seguinte, sendo necessária uma nova coleta de enxames (PEREIRA, 2005; TOLEDO et al., 2006; BRIGHENTI, 2009).

O tratamento onde se forneceu pólen de milho não transgênico (convencional) apresentou peso de pupa superior ao tratamento com pólen de milho transgênico que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, porém não diferindo significativamente do tratamento com pólen de milho transgênico que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 e CP4-EPSPS. Como se desconhece os teores de concentração de pólen *Bt* nos eventos testados, bem como no pólen do milho convencional, é possível deduzir que possuam concentrações diferentes, o que auxiliaria no entendimento destes resultados.

Em uma primeira análise os resultados parecem indicar que o menor peso corporal de pupas alcançado por todos os tratamentos à base de pólen de milho podem estar relacionados com o desequilíbrio nutricional da dieta. Embora o fornecimento dos aminoácidos essenciais para as abelhas seja importante, são escassos os estudos sobre o fornecimento de proteínas informando a composição correta de aminoácidos (PEREIRA et al., 2008). Haydak (1936), já destacava a importância das vitaminas contidas nos alimentos para abelhas como importantes na vida do inseto. Em dietas sem vitaminas as abelhas que emergem desenvolvem seus corpos e suas glândulas hipofaríngeas normalmente, porém, as larvas não crescem além de dois ou três dias e então desaparecem (HAYDAK, 1970). Analisando-se os resultados alcançados para o desenvolvimento das áreas de cria aberta, que não apontaram diferenças entre os tratamentos contendo pólen de milho convencional e os tratamentos sem pólen de milho (tratamento energético e o tratamento controle), e apresentaram os melhores resultados para a variável, pode-se concluir que não houve desequilíbrio nutricional nas dietas oferecidas as abelhas, portanto, outros fatores contribuíram para os resultados encontrados para o peso de pupas. Esta informação reforça que os efeitos adversos encontrados para as áreas de cria aberta devam ter relação com possíveis efeitos das proteínas transgênicas.

#### **5.4 Avaliação do comportamento higiênico**

Os dados encontrados não apresentaram distribuição normal, realizou-se a aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados encontrados para comportamento higiênico demonstraram

diferenças significativas entre os tratamentos testados (Kruskal-Wallis,  $\alpha = 5\%$ ,  $p < 0.01$ ), conforme Tabela 6.

**Tabela 6.** Comportamento Higiênico de *Apis mellifera* submetidas a dietas contendo pólen de milho transgênico e convencional, durante os períodos de outubro de 2013 a julho de 2014. Cidade das Abelhas, UFSC, Florianópolis - SC, 2013 e 2014.

Tratamentos	Comportamento Higiênico (%)										Média e Desvio Padrão
	30 out	17 nov	24 dez	29 jan	16 fev	24 mar	29 abr	17 mai	04 jun	10 jul	
Pólen milho evento VT PRO	94.5	92.4	92.2	88.7	88.5	88.7	87.3	87.4	87.6	86.4	89.40 *a ± 2.6939
Pólen milho evento VT PRO 2	94.6	92.7	92.2	87.3	87.7	87.5	87.2	87.5	87.5	87.3	89.18 ab ± 2.8229
Pólen milho convencional	94.2	93.8	93.6	93.7	93.7	93.7	93.6	93.7	93.6	93.6	93.73 bc ± 0.1763
PTS + ELC	94.6	93.5	93.5	94.7	93.8	93.6	93.7	93.6	93.7	93.7	93.86 c ± 0.4344
Florada disponível	94.5	94.4	94.4	93.8	94.8	94.7	93.7	93.6	93.5	93.7	94.12 c ± 0.4837

\*Letras diferentes indicam diferença significativa segundo o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Conforme percebe-se na Tabela 6, todos os tratamentos testados apresentaram média superior a 80% de comportamento higiênico. Gramacho & Goncalves (1997), citam que colmeias que possuem comportamento higiênico acima de 80% podem ser consideradas higiênicas.

Avaliando-se a percentagem de comportamento higiênico apresentados pelos tratamentos onde se utilizou pólen de milho transgênico (Pólen milho evento VT PRO e Pólen milho evento VT PRO 2) percebe-se que por ocasião da primeira avaliação encontrou-se os maiores valores de CH para os dois tratamentos, 94,56% e 94,6%, respectivamente. Ao longo das avaliações observa-se uma diminuição gradativa da taxa de comportamento higiênico para estes tratamentos.

Ainda que os dois tratamentos tenham confirmado CH, verifica-se em termos percentuais uma diminuição de 7,3 % e 7,23% para os tratamentos pólen de milho evento VT PRO e pólen de milho evento VT PRO2, respectivamente, quando comparados a primeira e a última avaliação. No caso do tratamento com pólen de milho não transgênico, ou seja, a linhagem isogênica, não se verifica esta variação nas taxas de CH. Bizzocchi (2014) encontrou resultados semelhantes trabalhando com fornecimento de dietas a base de pólen de milho *Bt* com proteínas Cry 1F. Segundo o autor, apesar de todas as colônias serem classificadas como higiênicas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, e as colmeias alimentadas com pólen de milho *Bt* manifestaram a menor taxa de CH após o final do fornecimento de alimento proteico artificial.

Esta informação pode ser indicativo de efeitos sub-letais do pólen de milho transgênico sobre o comportamento higiênico das colmeias. Assumindo-se que a composição centesimal dos eventos geneticamente modificados testados no experimento eram equivalentes a da linha isogênica (conforme pode-se verificar em CTNBio, Processo: 01200.003326/2008-61, 2009, em resposta aos detentores da tecnologia), pode-se aventar a hipótese de que efeitos sub-letais causados pela ação tóxica das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 sobre as abelhas foram responsáveis pelas menores taxas de comportamento higiênico, quando comparado aos tratamentos que não possuíam estas proteínas. Também no parecer técnico de liberação do milho MON 89034 não foram encontradas informações se foram realizados experimentos que comprovem que estes eventos Cry (Cry1A.105, Cry2Ab2) não provocam impactos sobre a sanidade de *A. mellifera*.

Os resultados alcançados neste trabalho podem contribuir para elucidação dos riscos dos OGM's sobre insetos não alvos, pois como verificado por Kaiser; Pham-Delègue; Ramirez-Romero (2001); Ludy & Lang (2006); Lang & Vojtech (2006); Prasifka et al. (2007) poucos estudos têm investigado os efeitos subletais de proteína *Bt* sobre os mesmos. Os efeitos subletais da proteína Cry podem em longo prazo prejudicar a sanidade das colmeias já que envolvem a redução do CH, mecanismo importante de defesa das abelhas contra pragas e doenças, que quando reduzido torna as abelhas mais vulneráveis ao ataque destas, podendo levar as abelhas a morte.



### 5.5 Análise de mel provenientes de colmeias de *Apis mellifera* da região oeste catarinense

As análises realizadas e os resultados encontrados demonstram a possibilidade do uso do teste de imunoensaio de fluxo lateral para detecção de OGM's em mel. Os resultados encontrados para as análises realizadas encontram-se disposto na Tabela 7.

Todas as amostras de mel coletadas foram provenientes de áreas agrícolas que continham eventos de milho e soja, sendo as principais marcas comerciais plantadas: cultivares de milho com o evento Herculex e evento Yield Gard e cultivares de soja com o evento Roundup Ready.

Nestas áreas as cultivares de milho foram semeadas para silagem no fim do mês de agosto de 2013, as cultivares de soja semeadas no final do mês de outubro de 2013 e realizado safrinha de milho nas duas áreas com semeadura em início de janeiro de 2014.

Os resultados encontrados demonstram que a distância estabelecida entre os apiários e as áreas de plantio de milho e soja foram determinantes para a detecção positiva e/ou negativa dos produtos transgenes nas amostras de mel avaliadas. Amostras de mel provenientes de apiários com distâncias de 3000 m das áreas de cultivos não apresentaram resultados positivos para quaisquer dos transgenes avaliados, indicando que a distância da área de forrageamento pode ter sido um impeditivo ao deslocamento das campeiras, visto que existiam áreas de milho e soja com os eventos testados através das tiras.

As amostras coletadas em distância máxima de 1000 m do apiário, apresentaram resultados diversos. As amostras A1, A2 e A4 apresentaram resultados negativos para os transgenes avaliados.

Analisando-se a flora apícola principal da área (informação fornecida por cada apicultor) é possível estabelecer algumas correlações.

A amostra A1 é proveniente de área com angico vermelho (*Parapiptadenia rígida*) e uva do japonês (*Hovenia dulcis*). Angico vermelho é uma espécie descrita no meio científico como melitófila, ainda que suas flores sejam pouco perceptíveis, porém bastante procuradas pelas abelhas, sendo considerada uma espécie apícola (CARVALHO, 1994). A uva do japonês também é considerada planta apícola, apresentando bom potencial melífero e produzindo pólen e néctar (CARVALHO, 1994a). As duas espécies são ditas de floração prolongada, sendo que angico vermelho floresce de novembro até

janeiro, e a uva do japão floresce de agosto a fevereiro. Pode ser possível que tanto a diversidade de flora apícola, quanto o extenso período de floração tenham sido suficientes para a coleta das campeiras, não necessitando forrageamento em áreas mais distantes.

**Tabela 7.** Detecção de proteínas transgênicas em amostras de mel através do método de tiras imunocromatográficas. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA, UFSC, Florianópolis - SC, 2015.

Amostras catalogadas	Proteína testada/Resultado		
	Cry 1Ab	RR	Cry1F
A1	-	-	-
A2	-	-	-
A3	+	+	+
A4	-	-	-
A5	+	+	+
B1	-	-	-
B2	-	-	-
B3	-	-	-
B4	-	-	-
B5	-	-	-
C1	-	-	-
C2	+	+	+
C3	+	+	+
C4	+	+	-
C5	+	+	-

"+" indica presença da proteína transgênica; "-" indica ausência da proteína transgênica.

As amostras A2 e A4 são provenientes de áreas com uva do japão, planta apícola, apresentando bom potencial melífero e produzindo pólen e néctar (CARVALHO, 1994a) e dita de floração prolongada, de agosto a fevereiro. Pode-se inferir que esta floração prolongada foi suficiente para o forrageamento das campeiras. Sabe-se que as abelhas melíferas são altamente fieis a uma espécie vegetal, e não possuem comportamento de voo aleatório, em diferentes direções (WOLLF; REIS; SANTOS, 2008). Bizotto & Santos (2015) referem

que as abelhas melíferas antes de partirem para a coleta de recursos, calculam gastos de energia para a viagem, podendo optar por deslocamentos mais curtos em busca de economia energética. Portanto, a floração disponível nas proximidades do apiário, em período prolongado, aliado à fidelidade vegetal, com conseqüente economia energética, pode explicar o não forrageamento nas lavouras transgênicas e o conseqüente resultado encontrado para as amostras.

As amostras A3 e A5 apresentaram resultados positivos para todos os transgenes avaliados. Estas duas amostras foram provenientes de áreas com eucalipto (*Eucalyptus* spp.), das espécies robusta e grandis. Para Marchini & Moreti, (2003) o eucalipto é considerado uma das melhores e mais abundantes plantas fornecedoras de alimento para a abelha. Conforme as informações recolhidas nestas áreas, as cultivares de milho foram semeadas para silagem no fim do mês de agosto de 2013, as cultivares de soja no final do mês de outubro de 2013 e realizado safrinha de milho nas duas áreas com semeadura em início de janeiro de 2014. Infere-se, portanto, que o florescimento tenha ocorrido nos últimos dias do mês de outubro para o milho safra e meados de março para o milho safrinha. A soja teve seu florescimento no começo do mês de dezembro. Portanto, estas áreas contaram com estes cultivares em floração durante aproximadamente os meses de novembro, dezembro e março. Estas informações podem auxiliar ao entendimento dos resultados encontrados, visto que as espécies de eucaliptos disponíveis nestas áreas apresentam períodos de floração distintos, quais sejam: a espécie robusta possui floração entre os meses de março a abril e na espécie grandis a floração ocorre de abril a agosto. Avaliando-se os períodos de floração destas espécies, percebe-se uma lacuna entre os meses de setembro a fevereiro, ficando restrito o forrageamento as abelhas pelas espécies disponíveis no local, entre estas espécies cultivares de milho e soja. Sabugosa-Madeira & Abreu (2009) citam que apesar do milho não ser considerado uma planta melífera, é frequentemente utilizado pelas abelhas como fonte de pólen, sendo recolhido em um período do ano em que são relativamente escassas as plantas em floração. Em certas circunstâncias, pode representar mais de 80% da colheita semanal de pólen, sendo, por isso, considerado um alimento estratégico (SABUGOSA-MADEIRA *et al.*, 2007).

Dentre as amostras comerciais avaliadas, o mel certificado como produto orgânico, amostra C1, apresentou resultados negativos para os transgenes testados, indicando possível confiabilidade do produto, ainda

que se desconheça a área de flora apícola da coletas das operárias, já que demais tiras de detecção não foram testadas, para outras proteínas transgênicas. Tendo visto que o rótulo do produto indicava o local de origem como um município localizado no planalto norte catarinense, é possível inferir que o apiário seja minimamente afetado por áreas de cultivo de milho e soja, especialmente por tratar-se de produto orgânico, é esperado que cuidados maiores em relação às floras apícolas disponíveis sejam observados.

Para as demais amostras comerciais (C2 a C5) todas deram resposta positiva aos transgenes Cry1Ab e RR, indicando que as abelhas campeiras efetuaram coleta em áreas de milho e soja detentoras destas proteínas.

As amostras C2 e C3 além da resposta positiva as proteínas Cry1Ab e RR, também apresentaram resultados positivos a proteína Cry1F, indicando coleta de pólen em área com milho Herculex. Todas estas amostras comerciais, conforme disponível nos rótulos são provenientes de municípios da região oeste catarinense.

A região se destaca pelo valor da produção nas culturas de milho, soja, fumo, mandioca, cana-de-açúcar, trigo e feijão. Estas culturas juntas somam 96,9% da área plantada e 99,2% do valor da produção de lavoura temporária existente no território (CEPA, 2014). Os dados da região oeste catarinense mostram que o milho apresentou na Safra 2013 uma área plantada de 278,7 mil hectares e a cultura da soja 221,3 mil hectares de área plantada (CEPA, 2014). Sabe-se que a soja plantada no oeste catarinense é 99% transgênica e para a cultura do milho estima-se que 95% da semente utilizada seja transgênica. Esses dados parecem ser reveladores da exposição que as abelhas e seus produtos, especialmente o mel, estão sendo submetidos.

A atividade apícola neste cenário descrito como característico da região oeste catarinense, portanto, está estreitamente relacionada na atualidade (proximidades físicas, com provável visitação de abelhas) com a produção de cultivos transgênicos. Embora o pólen de milho tenha grandes dimensões (76 – 106µm), em comparação com o pólen das demais gramíneas, e tenha tendênci a para se depositar nas imediações, cada panícula produz cerca de 25 milhões de gr os de pólen, liberando cerca de 2 milhões de gr os de pólen por dia e por planta (AYLOR; SCHULTES; SHIELDS, 2003; JAROSZ et al., 2003). Portanto, um sistema agrícola de plantas de milho com 50.000 - 80.000 plantas por hectare possui um grande potencial de produção de pólen.

Estimativas da coleta de pólen de milho pelas abelhas, podem teoricamente, fornecer informações sobre a exposição do mel as proteínas transgênicas, expressas nos eventos milho e soja. Sabugosa-Madeira (2008) avaliou os fluxos polínicos de *A. mellifera*, e relatou que no verão, no Norte de Portugal, em zonas de cultivo de *Zea mays*, este contribuiu em cerca de 17% da dieta das abelhas. Louveaux & Albisetti (1963) verificaram que na ausência de outras fontes de pólen, o milho supriu cerca de 90% da demanda de pólen das colméias avaliadas em determinada região da França. De acordo com Trevisan et al (2013), esses fatos podem ser considerados indícios de que a exposição do mel as proteínas transgênicas possa ocorrer, diante da comprovada coleta desse material por *A. mellifera*.

Para o caso do mel orgânico, por exemplo, a região oeste catarinense pode futuramente em função do cultivo generalizado com plantas transgênicas estar comprometida para esta atividade.



## 6. CONCLUSÕES

- O teste de detecção imunocromatográfica da presença das proteínas Cry confirmaram a presença das proteínas transgênicas no pólen de milho dos eventos testados;

- O pólen transgênico dos cultivares de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 Cry2Ab2 e Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS causaram aumento na área de desenvolvimento de crias aberta e diminuição nas áreas de crias operculadas;

- O fornecimento de pólen de milho transgênico causou redução no peso de pupas de *Apis mellifera*;

- As dietas fornecedoras de pólen de milho expressando as proteínas Cry1A.105 Cry2Ab2 e Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS , causaram uma diminuição gradativa da taxa de comportamento higiênico;

- Do total de amostras de mel analisadas, seis amostras responderam positivamente para todos os transgenes avaliados: Cry 1Ab, Cry 1F e RR; comprovando que as abelhas forrageiam em plantas transgênicas;

- O teste de detecção imunocromatográfica através de tiras, foi eficiente para detecção da presença das proteínas transgênicas em mel.





## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A combinação gênica resultante da transgenia pode resultar em organismos expressando características inexistentes no ambiente, fato comparável à introdução de uma espécie exótica. Sob essa perspectiva, organismos geneticamente modificados, ou transgênicos, são considerados como promotores de riscos potenciais aos organismos não alvos e à biodiversidade e, portanto, devem passar por análise de risco antes de sua liberação no ambiente (BRASIL, 2005).

No Brasil as plantas de milho geneticamente modificadas foram liberadas para comercialização no ano de 2009, mas os estudos envolvendo riscos ambientais para organismos classificados como não alvos, destaque a *Apis mellifera*, foram realizados somente em condições *in vitro* e publicados como citações dos pareceres do processo de liberação comercial.

Estudos das reais condições á campo precisam ser intensificados. E a possível relação do impacto do pólen do milho *Bt* sobre a sanidade apícola, especialmente a ocorrência de ácaros e nosebose devem ser avaliados, a fim de comprovar se em longo prazo o pólen do milho *Bt* irão reduzir ainda mais o comportamento higiênico. Também se faz necessária a verificação da composição nutricional dos eventos avaliados para comprovação da presença de substâncias tóxicas para as abelhas.

A metodologia de alimentação utilizada foi favorável à investigação dos impactos sobre as colônias, mas é recomendado em novos trabalhos, avaliar os impactos de diferentes doses de pólen, maiores tempos de exposição e outras diferentes cultivares transgênicas, buscando assim elucidar melhor as causas dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (*Bt*) sobre colônias de *A. mellifera L.*

Apesar de existirem no Brasil muitas espécies nativas de abelhas melíferas, além de inúmeras espécies de abelhas solitárias, *A. mellifera*, é a espécie dominante para a apicultura, apesar de não ser uma espécie nativa. O país vem se destacando na produção de mel, estando entre os quinze principais países produtores.

No Estado de Santa Catarina, os estudos sobre os impactos da utilização dos OGM's se restringem na identificação da presença de transgenes em produtos alimentícios comercializados como forma de verificar o atendimento às normas de rotulagem previstas (BROD & ARISI, 2008; DINON; MELO; ARISI, 2008).

O mel como produto das abelhas, não se enquadra na obrigatoriedade de rotulagem, exigida somente quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, a partir do limite de 1% do produto final de acordo com o decreto N° 4.680 de 25 de abril de 2003. Sob este aspecto, não há no País exigência de análise de ocorrência de proteínas transgênicas na composição química do mel.

O teste de imunoensaio de fluxo lateral para detecção de OGM's em mel mostrou-se eficiente, mas se faz necessário aumentar o número de amostras avaliadas, bem como testar a detecção para outras proteínas presentes nos eventos de milho e soja utilizados no campo.

A adequação e clareza das informações são de vital importância para consumidores que, por razões diversas, não desejariam consumir alimentos geneticamente modificados, independente da percentagem existente nos mesmos.

## REFERÊNCIAS

Aidar, D. S.; Campos, L. A. O. Manejo e manipulação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Apidae: Meliponinae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n. 1, Mar. 1998.

Agapito-Tenfen, S.; Guerra, M.; Wikmark, O.-G.; Nodari, R. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different 320 agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, 11(1), 46. 2013.

Al-Tikrity, W. S.; Hillmann, R. C.; Benton, A. W. A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. **American Bee Journal**, Hamilton, v.111, p. 20-26, 1971.

Arpaia, S. Ecological impact of *Bt*-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of cryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Genetics and Breeding**, 50: 315-319. 1996.

Arpaia, S.; Di Leo, G. M.; Fiore, M. C., Schmidt j.; Scardi, M. Composition of arthropod species assemblages in Bt-expressing and near isogenic eggplants in experimental fields. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 213–227, 2007.

Arpaia, S.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Pires, C. S. S.; Silveira, F. S. **Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects**. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds.) Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing *Bt* cotton in Brazil. **Cambridge**: CABI Publishing, 155-174. 2006.

Aylor, D. E.; Schultes, N.; Shields, E. An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. **Agricultural and Forest Meteorology**, 119, 111-129. 2003.

Babendreier, D.; Kalberer, N.M.; Romeis, J.; Fluri, P.; Mulligan, E.; Bigler, F. Influence of *Bt*-transgenic pollen, *Bt*-toxin and protease

inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. **Apidologie**, 36, 585–594. 2005.

Bertoldi, C. R. C. **Meliponicultura uma alternativa sustentável**. Embrapa. Agosto de 2008. Disponível em <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/agosto/2a-semana/meliponicultura-uma-alternativa-sustentavel>>, acesso em 03/07/2014.

Bespalkok Filho, J. C.; Kobayashi, A. K.; Pereira, L. F. P.; Hissano, Z.; Vieira, L. G. E. In vitro adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 27-34, 2001.

Bizotto, L. A.; Santos, R.S. S. Dinâmica de voo e coleta de recursos por *Apis mellifera* em pomar de macieira. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 3499. 2015.

Bizzocchi, L. **Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *Apis mellifera* L.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2014. 65p.

Bøhn, T.; Cuhra, M.; Traavik, T.; Sanden, M.; Fagan, J.; Primicerio, R. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chemistry**, 153(0): 207-215. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20/10/2000, **Padrão de Identidade e Qualidade do Mel**. DOU de 23/01/2001, Seção 1, p. 18-23. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/das/dispoa/instrunormativa11.htm>

BRASIL. Presidência da República. **Lei de Biossegurança**, lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. 2005. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm).

Brighenti, D. M. **Dietas energéticas e protéicas para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. Lavras, 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras.

Brod, F. C. A.; Arisi, A. C. M. Quantification of Roundup Ready TM soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, p. 1027-1032, 2008.

Brodtschneider, R.; Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, 41: 278–294. 2010.

Brodsgaard, H. F.; Brodsgaard, C. J.; Hansen, H.; Lövei, G. L. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. **Apidologie**, 34, 139-145. 2003.

Brown, K.S. Prescription: one plant please. **Bioscience**, 46, v. 2 p.82, 1996.

Buchmann, S.; Reppner, B. **Letters from the hive: an intimate history of bees, honey, and humankind**. Bantam Dell. New York. 275 p. 2005.

Camargo, R. C. R.; Rêgo, J. G. S.; Lopes, M. T. R.; Pereira, F. M.; Melo, A. L. **Boas Práticas na Colheita, Extração e Beneficiamento do Mel**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 28 p. Documentos 78. 2003.

Campbell, P. O. Q. Super foods: agricultural products and genetic engineering. **Biology Digest**, n.1, 23, 10-17, 1996.

Carvalho, P. E. R. **Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg)**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 24p. (EMBRAPA-CNPQ Florestas. Circular Técnica, 23).

Carvalho, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso de Madeira**. EMBRAPA - CNPQ; Brasília, 1994a. 639p.

Castagnino, G. L. B.; Message, D.; Marco Júnior, P.; Fernandes Filho, E.I. Avaliação da eficiência nutricional do substituto de pólen por meio

de medidas de áreas de cria e pólen em *Apis mellifera*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.295, p.307-315, mar./abr. 2004.

Castagnino, G. L.; Arboitte, M. Z.; Lengler, S.; Garcia, G. G.; Menezes, L. F. G. Desenvolvimento de núcleos de *Apis mellifera* alimentados com suplemento aminoácido vitamínico, Promotor L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, 685-688, mar./abr., 2006.

CEPA-SC. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina** - 2013-2014. Florianópolis: EPAGRI/Cepa-SC, 2014. 211p. Disponível em [http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese\\_2014/Sintese\\_2014.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2014/Sintese_2014.pdf)

Coelho, M. S.; Silva, J. H. V.; Oliveira, E. R.; Araújo, J. A.; Lima, M. R. Alimentos convencionais e alternativos para abelhas. **Caatinga**, Mossoró, v.21, n.1, p. 1-9, jan./mar. 2008.

Conceição, F. R.; Moreira, A. N.; Binsfeld, P. C. Detecção de organismos geneticamente modificados. In: Binsfeld, P.C. Biossegurança em biotecnologia. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2004. p.145-169.

Conceição, F. R.; Moreira, A. N.; Binsfeld, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.315-324, jan-fev, 2006.

Craig, W.; Tepfer, M.; Degrassi, G.; Ripandelli, D. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. **Euphytica**, 164:853-80. 2008.

Crailsheim, K.; Schneider, L.; Hrassnigg, N.; Buhlmann, G.; Brosch, U; Gmeinbauer, R.; Schoffmann, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera* carnica): dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, 38, 409-419. 1992.

Crane, E. **Bees and beekeeping-science, practice and world resources**. London: Neinemann Newnes, 614 p. 1990.

Crickmore, N.; Baum, J.; Bravo, A.; Lereclus, D.; Narva, K.; Sampson, K.; Schnepf, E.; Sun, M.; Zeigler, D.R. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. 2014. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em 28 agos. 2014.

Cruz, J. C.; Pereira Filho, I. A.; Simão, E. P. **478 cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2014/2015**. Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 35 p. Sete Lagoas-MG (Documentos/ Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 167). Primeira impressão (2014): on line.

De Jong, D.; Message, D. New and exotic disease threats for Brazilian bees. In: Encontro sobre abelhas, 8, Ribeirão Preto, SP, **Anais...**2008.

Decourtye A.; Devillers J.; Cluzeau S.; Charreton M.; Pham-Delègue M. H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybee under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57, 410–419. 2004.

Dinon, A.Z.; Melo, J.E.; Arisi, A.C.M. Monitoring of MON810 genetically modified maize in food in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 1, p.515-518, 2008.

Dische, E. Color reactions of carbohydrates. In: Whistler, R. L.; Wolfram, M. L. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 2008. v. 1, p. 477-512.

Fontes, E. M. G.; Melo, P. E. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 815-843.

Gonçalves, J. C.; Message, D.; Teixeira, A. B.; Pereira, F. de M.; Lopes, M. T. do R. **Comportamento higiênico em abelhas africanizadas**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 20p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio-Norte, ISSN 1413-1455. 2008.

Gonçalves, L. S.; Gramacho, K. P. Comportamento higiênico de abelhas *Apis mellifera*: crias de operárias versus crias de zangão. In: Encontro

sobre abelhas, 4., 2000, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, p. 66-70. 2000.

Gonçalves, L. S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 87. 2006.

Gramacho, K. P.; Gonçalves, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: Congresso Latino Iberoamericano de Apicultura, 4. 1994. **Anais...** Cordoba-Argentina. p.45. 1994.

Gramacho, K. P., Gonçalves, L. S. A comparative study of hygienic behaviour in several honey bee races. In: **International Congress of Entomology**, 20. Proceedings. Firenze, Italy, p. 445.1996.

Gramacho, K. P., Gonçalves, L. S. Comportamento higiênico em *Apis mellifera* e novas perspectivas sobre o controle da Varroatose. **Mensagem doce**. n. 41, p. 4-9. 1997.

Gramacho, K. P. **Estudo do comportamento higienico em *Apis mellifera* como subsidio a programas de selecao e melhoramento genetico em abelhas**. Tese (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. 106p.

Gramacho, K. P. **Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera***. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

Hanley, A.; Huang, Z.; Pett, W. Effects of dietary transgenic *Bt* corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, 42, 77-81. 2003.

Haydak, M. H. Value of foods other than pollen in nutrition of the honeybee. **Journal of Economic Entomology**, s/1, v.20, n.5, p. 870-877, 1936.



Haydak, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, 15, 143–156. 1970.

Head, G.P.; Greenplate, J. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt Crops. **GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain**, v.3, p.144-153, 2012.

Heather, R. M.; Gard, W. O. The effects of pollen availability during larval development on the behavior and physiology of spring-reared honey bee workers. **Apidologie**, 37: 533-546. 2006.

Heinemann, J. A.; Agapito-Tenfen, S. Z.; Carman, J. A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. **Environment International**, 55:43-55. 2013.

Hendriksma, H. P.; Hartel, S.; Steffan-Dewenter, I. Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt maize on in vitro reared honey bee larvae. **Plos One**, v. 6 (12). 2011.

Hilbeck A; Schmidt J. E. U. Another view on Bt proteins - how specific are they and what else might they do? **Biopesticides International**, 2(1):1–50. 2006.

Huang, Z.; Hanley, A.; Pett, W.; Langenberger, M., Duan, J. Field and semifield evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and development of worker bees. **Journal of Economic Entomology**, 97, 1517-1523. 2004.

Imperatriz-Fonseca, V. L. **La meliponicultura y la polinización**. Vida apícola, Barcelona, n. 126, p. 57-58, jul/ago 2004.

Imperatriz-Fonseca, V. L.; Contrera, F. A. L.; Kleinert, A. M. P. A meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores. **XV Congresso Brasileiro de Apicultura e 1 Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, Natal – RN, Brasil, 2004.

Jarosz, N.; Loubet, B.; Durand, B.; McCartney, A.; Foueillassar, X.; Huber, L. Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen. **Agricultural and Forest Meteorology**, 119, 37-51. 2003.

Kaatz, H. H. **Effects of Bt maize pollen on the honeybee**. Jena University, Institute of Nutrition and Environment. 2005.

Kaiser, L.; Pham-Delègue, M.H.; Ramirez-Romero, R. *Bt* corn and insect helpers. **Biofutur**, 207, 30–33. 2001.

Kerr, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, 39(2): p. 3-5, 1967.

Konig, A.; Cockburn, A.; Crevelc, R.W.R.; Debruynd, E.; Grafstroeme, R.; Hammerlingf, U.; Kimberg, I.; Knudsenh, I.; Kuiperi, H.A.; Peijnenburgi, A.A.C.M.; Penninksj, A.H.; Poulsenh, M.; Schauzuk, M.; Wall, J.M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, 42, 1047–1088. 2004.

Lang, A.; Vojtech, E. The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). **Basic and Applied Ecology**. 7, 296–306. 2006.

Lee, M.K.; Walters, F, S; Hart, H.; Palekar, N.; Chen, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**. 69:4648-4657. 2003.

Leite, N. A.; Mendes, S. M.; Waquil, J. M.; Pereira, E. J. G. **O Milho Bt no Brasil: A Situação e a Evolução da Resistência de Insetos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 46 p.

Lengler, S. Alimentação artificial de abelhas. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 13. 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2000.

Lengler, S. Princípios básicos na nutrição alimentar de abelhas. In: Seminário Estadual de Apicultura, 8, Expoapis, 7, Encontro Estadual de Meliponicultores, 2., 2003, Horizontina, RS. **Anais...** 2003. CD-ROM.

Lengler, S. **Inspeção e controle de Qualidade do mel.** 2008. Disponível em: <[www.sebraern.com.br/apicultura/pesquisas/inspecao\\_mel01.doc](http://www.sebraern.com.br/apicultura/pesquisas/inspecao_mel01.doc)> Acesso em: 23/01/2012.

Lima, M. A. P.; Pires, C.S.S.; Campos, L. A. O. Plantas transgênicas alteram o comportamento das abelhas?. In: **XXII Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2008, Uberlândia. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. 2008.

Liu, W.; Wang, F.; Zhang, F.; Meng, Z.; Wang, F. 2000. Evaluation on role of predators in *Helicoverpa armigera* control. **Chinese Journal of Biological Control**, 16: 97-101.

Lorente, M. G.; Carretero, C. L.; Martín, R. A. P. Sensory attributes and antioxidant capacity of spanish honeys. **Journal of Sensory Studies**, 23, 293-302, 2008.

Lourenção, A. L. F.; Barros, R.; Melo, E. P. de. **Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno 2009: Milho *Bt*: Uso Correto da Tecnologia.** 2009.

Louveaux, J.; Albisetti, J. **Observations préliminaires sur la récolte du pollen par les abeilles dans "les grandes landes" de la forêt Landaise.** *Annalles Abeille*, Paris, v. 6, p. 229-234, 1963.

Lövei, G. L.; Arpaia, S. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 114, 1–14. 2005.

Ludy, C.; Lang, A. *Bt* maize pollen exposure and impact on the garden spider, *Araneus diadematus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 118, 145–156. 2006.

Malaspina, O.; Souza, T. F.; Zacarin, E. C.; Cruz, A. S.; Jesus, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: Encontro sobre abelhas, 8, Ribeirão Preto, SP, **Anais...**2008.

Malone, L. A. **Literature review on genetically modified plants and bee products.** Disponível em: <[http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/estudos\\_alimentares16.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/estudos_alimentares16.pdf)> Acessado em 12/08/2014

Malone, L. A.; Pham-Delègue, M. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, 32, 287-304. 2001.

Manyangarirwa, W.; Turnbull, M.; Mccutcheon, G.S.; Smith, J.P. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: how sustainable is this strategy? **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.781-785, 2006.

Marchini, L. C.; Moreti, A. C. Comportamento de coleta de alimento por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) em cinco espécies de eucalyptus. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, 11(2): 75-79. 2003.

Marchini, L C.; Moreti, A.C.C.C.; Otsuk, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 8-17, 2005.

Marchini, L.C.; Sodré, G.S.; Moreti, A.C.C.C. **Produtos Apícolas: Legislação Brasileira.** 1º ed. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2005. 130p.

Masson, C.; Arnold, G. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the worker bee. **Journal of Insect Physiology**, 30, 7–14. 1984.

Masson, C.; Pham-Delègue, M.H.; Fonta, C.; Gascuel, J.; Arnold, G.; Nicolas, G.; Kerszberg, M. Recent advances in the concept of adaptation to natural odor signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. **Apidologie**, 24, 169–194. 1993.

Mateus, S. **Abundância relativa, fenologia e visita as flores pelos Apoidea do Cerrado da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio – SP**, 168p. Dissertação (Mestrado Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1998.

Melathopoulos, A.; Nelson, D.; Clark, K. High velocity electron-beam radiation of pollen and comb for the control of *Paenibacillus larvae subspecies larvae* and *Ascosphaera apis*. **American Bee Journal**, 144, 714-720. 2004.

Menezes, L.; Cunha, J.; Bisinotto, F.; Attie, J. Relatório biotecnologia. **Céleres**, p. 1-7, 2011.

Message, D. **Efeito das condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera***. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 136p. 1979.

Message, D.; Goncalves, L. S. Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas) In: Congresso brasileiro de apicultura, 5; Congresso latino-ibero-americano de apicultura, 3, Viçosa, 1980. **Anais...** Viçosa, Editora Imprensa Universitária da UFV. p 140-141.1980.

Michener, C. D. **The Bees of the World**. Baltimore, Johns Hopkins University Press, Second edition, 953p. 2007.

Moar, W. J.; Anilkumar, K. J. The power of pyramid. **Science**, v.318, p.1561-1562, 2007.

Nascimento, M. S.; Von Pinho, I. V.; Cantelmo, N, F.; Von Pinho, É. V. de R; Von Pinho, R. G. Detecção de eventos transgênicos de milho através do teste de tiras imunocromatográficas. **Anais XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo** - Águas de Lindóia , 2012.

Newton, D. C.; Ostasiewski, Jr., N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.

Ninni, K. **O misterioso sumiço das abelhas**. Notícias. O Estado de São Paulo. 2011. Disponível em:<[www.estadao.com.br/noticias/impresso,o\\_misteriososumicodas-abelhas,671171,0.htm](http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,o_misteriososumicodas-abelhas,671171,0.htm)>. Acesso em 20 abril 2015.

Nobrega, F. G. da. Processo: 01200.003326/2008-61, **Descrição do OGM**: Milho que expressa a proteína bacteriana Vip3Aa1 resistente a insetos MIR162. 2009. Disponível em: <[www.ctnbio.gov.br/upd\\_blob/0001/1221.doc](http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1221.doc)>. Acesso em 03 jan.2014.

Nodari, R. O.; Guerra, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p.81-116, 2001.

Oldroyd, B. P. What's Killing American Honey Bees? **PLOS Biology**, 5: 6-168. 2007.

Orth, A. I.; Matos, J. Z. O declínio dos polinizadores no mundo: recomendações para reverter o quadro atual. In: Congresso brasileiro de apicultura, 13, Florianópolis, SC, **Anais...**2000.

Park, O. W.; Pellet, F; paddock, F. B. Disease resistance and American foulbrood. **American Bee Journal**, v. 77, p 20-25, 1937.

Pereira, F. M. **Desenvolvimento de ração protéica para abelhas *Apis mellifera* utilizando produtos regionais do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, 170p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará. 2005.

Pereira, F. M. **A importância da alimentação das colônias de abelhas durante a entressafra**. Agrosoft Brasil, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. Disponível em: [www.agrosoft.org.br/agropag/103590.htm](http://www.agrosoft.org.br/agropag/103590.htm). Acesso em: 22 set. 2014.

Pereira, F. M.; Lopes, M. T. R.; Camargo, R. C. R.; Vilela, S. L. O. **Produção de mel**. EMBRAPA, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 17/04/2014.

Pereira, F. M.; Lopes, M. T. R.; Camargo, R. C. R.; Vieira Neto, J. M.; Ribeiro, V. Q.; Souza, B. A.; Rocha, R. S.; Silva Neto, E. Desenvolvimento de colônias de *Apis mellifera* alimentadas com rações alternativas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2008.

Pereira, R. A. **Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico**. Ribeirão Preto, 121p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Biologia. 2008.

Pinto, M. R.; Miguel, W. Mortalidade de abelhas *Apis mellifera* em Santa Catarina: intoxicação por inseticidas carbamatos. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 35, Gramado, RS. 2008.

Pinto, M. R.; Orenha, C.E.; Leite, F. P. L.; Dallmann, P.R. Avaliação de áreas de cria e de reserva de alimento em colônias de *Apis mellifera* africanizadas submetidas a diferentes dietas. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 35, Gramado, RS. 2008.

Prasifka, P.L., Hellmich, R.L., Prasifka, J.R., Lewis, L.C. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of monarch butterfly larvae. **Environmental Entomology**, 36, 228–233. 2007.

Ramirez-Romero, R.; Desneux, N.; Decourtye, A.; Chaffiol, A.; Pham-Delègue, M. Does cry 1ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* l. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 70, 327-333. 2008.

Romeis, J.; Hellmich, R. L.; Candolfi, M. P.; Carstens, K.; De Schrijver, A.; Gatehouse, A. M. R.; Herman, R. A.; Huesing, J. E.; McLean, M. A.; Raybould, A.; Shelton, A. M.; Waggoner, A. Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. **Transgenic Research**, 20:1-22. 2011.

Rothenbuhler, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killer brood. **American Zoology**, 4: 11-123, 1964.

Sabugosa-Madeira, J. B. C. **Estudo comparativo dos fluxos polínicos anemófilos e entomófilos (*Apis mellifera* spp) e respectivo contributo na produtividade agrícola e qualidade dos produtos da colmeia.** 145 p. Tese (Doutorado) - Universidade do Porto, Porto. 2008.

Sabugosa-Madeira, J. B.; Abreu, I.; Ribeiro, H.; Cunha, M. Bt transgenic maize pollen and the silent poisoning of the hive. **Journal of Apiculture Research**, 46, 57-58. 2007.

Sabugosa-Madeira, B.; Abreu, I. O Pólen de milho geneticamente modificado. Possíveis implicações no desequilíbrio ecológico das colmeias. **Revista Real Academia Galega de Ciências**. Vol. XXVIII. Págs. 71-85. 2009.

Salomé, J. A. **Manutenção de colmeias frente às pressões ambientais.** Sistema de inteligência setorial. jun. 2009. 20p.

Sanford, M. T. The africanized honey bee in the americas: a biological revolution with human cultural implications. *American Bee Journal*, Five Parts, March thru July. 2006. Disponível em: <[http://apisenterprises.com/papers\\_htm/Misc/AHB%20in%20the%20Americas.htm](http://apisenterprises.com/papers_htm/Misc/AHB%20in%20the%20Americas.htm)>. Acesso em 20/04/14.

Santos, I. A. A vida de uma abelha solitária. **Ciência Hoje**, nº. 179, jan. 2002. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/>>. Acessado em: 30/10/14.

Schafascheki, T. P.; Padilha, M. T.; Santos, I. I.; Padilha, J. C. F.; Braga, F. E. Efeito da suplementação alimentar sobre as características produtivas e reprodutivas de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Biotemas**, Itajaí – SC, Brasil, v.21, n.4, p. 99-104, dez. 2008.

Schlabitzy, C.; Silva, S. A. F. da; Souza, C. F. V. de. Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos em mel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. ISSN: 1981-3686/ v. 04, n. 01, p. 80-90, 2010.



Silva, R. H. D. Manejo alimentar para produção de enxames de abelhas *Apis mellifera*. In: Congresso Brasileiro de Nutrição Animal, 1, 2008, Fortaleza - Ceará, **Anais...** 2008.

Silveira, F. A. **Flora apícola e planejamento de atividades no apiário**. Informe Agropecuário, Belo horizonte, v.13, n.149, p. 27-32. 1987.

Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. **Abelhas Brasileiras – Sistemática e Identificação**. 1. ed. Belo Horizonte: 2002. 253p.

Sokol, R. The influence of a multimonth persistence of Fluwarol in a hive of a honey bee colony. **Medycyna Weterynaryjna**, 52: 718-720. 1996.

Spivak, M. Impactos do desaparecimento das abelhas no cenário internacional. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 17 e de Meliponicultura, 3, Belo Horizonte, MG, **Anais...**2008.

Spivak, M.; Reuter, G. S. Varroa jacobsoni infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 326-331, 2001.

Storer, N.P.; Thompson, G.D.; Head, G.P. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. **GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain**, v.3, p.154-162, 2012.

Syngenta. **Biotecnologia: a Syngenta sempre fez primeiro**. 2010. Disponível em: <http://www.syngenta.com/country/br/pt/sobresyngenta/biotecnologia/Pages/biotecnologianobrasil.aspx>. Acesso em: 10/05/2014.

Taylor, M. L.; Hartnell, G.; Nemeth, M.; Karunanandaa, K.; George, B. Comparison of broiler performance when fed diets containing corn grain with insect-protected (corn rootworm and European corn borer) and herbicide-tolerant (glyphosate) traits, control corn, or commercial reference corn—revisited. **Poultry Science**, 84: 1893-1899. 2005.

Teixeira P., Valle S. **Biossegurança**. Uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1996.

Terada, R.; Urawa, H.; Inagaki, Y.; Tsugane, k.; Iida, s. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. **Nature Biotechnology**, 1030–1034, 2002.

Tiedje, J. M.; Colwell, R. K.; Grossman, Y. L.; Hodson, R. E.; Lenski, R. E.; Mack, R. N.; Regal, P. J. The planned introduction of genetically engineered organisms – Ecological considerations and recommendations. **Ecology**, v.70, n.2, p.298-315. 1989.

Toledo, V. A. A.; Toral, F. L. B.; Miranda, S. B.; Hashimoto, A. S.; Silva, W. R. Ocorrência e coleta de colônias e de enxames de abelhas africanizadas na zona urbana de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.28, n.3, p. 353-359, jul-set. 2006.

Tozzini A.C. Detección de OGMs en la Cadena Agroalimentaria. In: ECHENIQUE, V. et al. **Biocología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA. 409-424. 2004.

Traavik T., Ching L. L. (ed.). **Biosafety first** – holistic approaches to risk and Uncertainty in genetic engineering and genetically modified organisms. Trondheim: Tapir Academic Press, 2007.

Trevisan, H.; Aguiar, A.; Sabugosa-Madeira, B.; Carvalho, A. G.; Abreu, I. Análise do efeito do pólen do milho transgênico resistente a insetos sobre o desenvolvimento de *Galleria mellonella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) e possíveis conseqüências ecológicas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 796-804, July/Aug. 2013.

Uberlacker, B.; Klinge, B.; Werr, W. Ectopic expression of the maize homeobox genes ZmHox1a or ZmHox1b causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. **Plant Cell**, 8: 349-362. 1996.

Varzakas, T.H.; Arvanitoyannis, I.S.; Baltas, H. The politics and science behind GMO acceptance. **Critical Review in food science and nutrition**. 335-361, 2007.

Vitali, M. de J.; Dutra J. C. S.; Machado V. L. L. Entomofauna visitante de *Belamcanda chinensis* (L). DC (Iridaceae) durante o período de floração. **Revista Brasileira de Zoologia**, 12 (2): 239-250. 1995.

Winston, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 1987.

Woodrow, W. A; Holst, E. C. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. **Journal of Economic Entomology**, 35 (3): 327-330, 1942.

Zerbo, A. C.; Moraes, R. L. M.; Brochetto-Braga, M. R. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* Hymenoptera: Apidia: Meliponinae: midgut proteolytic activity and pollen/digestion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 129: 139-147. 2001.

Zhuang, M.; Gill, S.S. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: G. Voss and G. Ramos, eds. **Chemistry of Crop Protection, Progress and Prospects in Science and Regulation**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. p. 213-236. 2003.



## ANEXO 1

Resumo geral de plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no Brasil, atualizado em 15/06/2015, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Produto	Nome Comercial	Identificador único	Evento único	Organismo Doador	Característica	Proteína	Requerente	Ano de aprovação
Soja	Roundup Ready	MON-Ø4032-6	GTS-40-3-2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	Monsanto	1998
	Cultivance	BPS-CV127-9	BPS-CV-127-9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerante a Herbicida	Csr-1-2	BASF & Embrapa	2009
	Liberty Link TM	ACS-GMØØ5-3	A2704-12	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	PAT	Bayer	2010
	Liberty Link TM	ACS-GMØØ6-4	A5547-127	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	PAT	Bayer	2010
	Intacta RR2 PRO	MON-87701-2 x MON-89788-1	MON87701 & MON89788	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry1Ac	Monsanto	2010
	***	***	DAS-68416-4	<i>Delftia acidovorans</i> <i>Streptomyces iridochromogenes</i>	Tolerante a herbicida	aad12 pat	Dow Agrosiences	2015

Continuação ...

<b>Milho</b>	Yeld Gard	MON-ØØ810-6	MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1Ab	Monsanto	2007
	Liberty Link	ACS-ZMØØ3-2	T25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	PAT	Bayer	2007
	TL	SYN-BTØ11-1	Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos Tolerante a herbicidas	Cry1Ab PAT	Syngenta	2007
	Roundup Ready 2	MON-ØØ6Ø3-6	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	Monsanto	2008
	TG	MON-ØØØ21-9	GA21	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida	mEPSPS	Syngenta	2008
	Herculex	DAS-Ø15Ø7-1	TC1507	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1F PAT	Du Pont & DowAgroScience	2008
	YR YieldGard/RR2	MON-ØØ6Ø3-6 MON-ØØ810-6	NK603 & MON810	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry1Ab	Monsanto	2009
	TL/TG	SYN-BTØ11-1 MON-ØØØ21-9	Bt11 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>S. viridochromogenes</i> <i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida Resistenmte a insetos	Cry1Ab PAT mEPSPS	Syngenta	2009
	Viptera-MIR162	SYN-IR162-4	MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Insetos	VIP3Aa20	Syngenta	2009

Continuação ...

Milho	HR Herculex/RR2	DAS-Ø1507-1 MON-ØØ6Ø3-6	TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto e Tolerante a Herbicida	Cry1F PAT CP4-EPSPS	Du Pont	2009
	Pro	MON-89Ø34	MON89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2	Monsanto	2009
	TL TG Viptera	SYN-BTØ11-1 SYN IR162-4 MON-ØØØ21-9	Bt11 & MIR162 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Zea Mays</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1Ab VIP3Aa20 mEPSPS	Syngenta	2010
	PRO2	MON-89Ø34-3 MON-ØØ6Ø3-6	MON89034 7 NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	Monsanto	2010
	Yield Gard VT	MON-88Ø17-3	MON88017	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry3Bb1	Monsanto	2010

Continuação...

Milho	Power Core PW/Dow	MON-89Ø34-3 DAS-Ø15Ø7-1 MON-ØØ6Ø3-6	MON89034 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS	Monsanto e Dow Agrosciences	2010
	HX YG RR2	MON-ØØ810-6 DAS-Ø15Ø7-1 MON-ØØ6Ø3-6	MON810 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	cry1Ab Cry1F PAT CP4EPSPS	Du Pont	2011
	TC1507xMON810	DAS-Ø1507 & MON810	TC1507 & MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1F Cry1Ab PAT	Du Pont	2011



Continuação ...

MON89034 x MON88017	MON-89Ø34-3 MON-88Ø17-3	MON89034 & MON88017	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4-EPSPS	Monsanto	2011
Herculex XTRA™ maize	DAS-Ø15Ø7-1 DAS-59122-7	TC1507 x DAS-59122-7	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1F PAT cry34Ab1 cry35Ab1	Du Pont & DowAgro Science	2013
Vipter a4	SYN-BTØ11-1 SYN IR162-4 SYN-IR6Ø4-5 MON-ØØØ21-9	Bt11xMIR162xMIR604 xGA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes/Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1Ab PAT VIP3Aa20 mcry3A mEPSPS	Syngenta	2014

Continuação...

MIR 604	SYN-IR604	MIR604	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	mcry3A	Syngenta	2014
***	***	DAS-40278-9	<i>Sphingobium herbicidorovans</i>	Tolerante a herbicida	aad-1v3	Dow Agrosciences	2015
***	MON-ØØ6Ø3-6ACS-ZMØØ3-2	NK603 x T25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces viridocromogenes</i>	Tolerante a herbicida	CP4-EPSPS PAT	Monsanto	2015
***	DAS-Ø15Ø7-MON-ØØ810 SYN-IR162-4	TC15Ø7 x MON81Ø x MIR162 x NK6Ø3	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a herbicida & resistência a insetos	cry1F cry1Ab PAT VIP3Aa20 CP4-EPSPS	Du Pont	2015
***	DAS-Ø15Ø7-1 SYN-IR162-4	TC1507xMIR162xNK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerancia a herbicida & resistência a insetos	cry1F PAT VIP3Aa20 CP4- EPSPS	Du Pont (RN15)	2015

Continuação ...

***	DAS-Ø15Ø7-1 SYN-IR162-	TC1507xMIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Bacillus</i>	Tolerância a herbicidas & resistência a insetos	cry1F PAT VIP3Aa20	Du Pont (RN15)	2015
***	SYN-IR162-4 MON-ØØ6Ø6	MIR162xNK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerância a herbicidas & resistência a insetos	VIP3Aa20 CP4-EPSPS	Du Pont (RN15)	2015
***	MON-ØØ810-6 SYN-IR162-4	MON810xMIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ab VIP3Aa20	Du Pont (RN15)	2015
***	DAS-Ø15Ø7-1 MON-ØØ810-	TC1507 x MON810 x MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerância a herbicidas & resistência a insetos	Cry1F pat VIP3Aa20 cry1Ab	Du Pont	2015

Continuação ...

Algodão	Bolgard I	MON-ØØ531-6	MON531	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a insetos	Cry1Ac	Monsanto	2005
	Roundup Ready	MON-Ø1445-2	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	Monsanto	2008
	Liberty Link	ACS-GHØØ1-3	LLCotton25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	PAT	Bayer	
	Bolgard I Roundup Ready	MON-ØØ531-6 MON-Ø1445-2	MON531 & MON1445	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry1Ac CP4-EPSPS	Monsanto	
	Widestrike	DAS-24236-5 DAS-21Ø23-5	281-24-236 & 3006-210-23	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry1Ac Cry1F PAT	Dow Agrosociencias	

Continuação ...

Algodão	Bolgard II	MON-15985-7	MON15985	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Insetos	Cry2Ab2 Cry1Ac	Monsanto	
	GlyTol	BCS-GHØØ2-5	GHB614	<i>Zea mays</i>	Tolerante a herbicida	2mEPSPS	Bayer	
	TwinLink	BCSHØØ4-BCS-GHØØ5-8	T304-40 & GHB119	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>S. hygroscopicus</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicidas	Cry1Ab Cry2Ae PAT	Bayer	
	MON88913	MON-8913-8	MON88913	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	Monsanto	
	GlytolxTwinLink	BCS-GHØØ2-BCS-GHØØ4-BCS-GHØØ5-8	GHB614 x T304-40 x GHB 119	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i> <i>Zea mays</i>	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry1Ab, cry2Ae,2meps ps	Bayer	

Continuação ...

Algodão	GTxLL	BCS-GHØØ 2-5 ACS-GHØØ 1-3	GHB614 x LLCotton25	<i>Zea mays/Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida	2mepsps, bar	Bayer	
	BolgardII Roundup Ready Flex	MON1 5985-7 x MON8 8913-8	MON 15985 x MON 88913	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	cry1Ac e cry2Ab2 e CP4-EPSPS	Monsanto	
Feijão	Embrapa 5.1	BEM-PVØ51-1	Embrapa 5.1	<i>BGMV - Bean Golden Mosaic Virus</i>	Resistente ao Vírus Mosaico dourado do feijoeiro	Não se aplica	Embrapa	
Eucalipto	***	***	H421	<i>Arabidopsis thaliana</i>	aumento volumétrico de madeira	cell1	Futuragene	

\*\*\* Aguardam denominações

## ANEXO 2

103

Área média de cria aberta (CA) e operculada (CO) em cm<sup>2</sup>, de abelhas africanizadas *A. mellifera*, submetidas a cinco tratamentos no período de outubro de 2013 a julho de 2014. Cidade das Abelhas, Florianópolis- SC, 2013 e 2014.

Tratamento*	Lado do favo	Variáveis	2013				2014										
			01/nov	19/nov	07/dez	26/dez	13/jan	31/jan	18/fev	08/mar	26/mar	13/abr	01/mai	19 mai	06/jun	24/jun	12/jul
1	Lado	CA	32.68	9.24	56.12	35.44	48.68	43.72	40.68	43.16	36.4	60.68	75.44	76.4	74.2	63.16	53.92
	1	CO	367.02	384.4	336.76	358.96	344.92	353.84	350.24	351.92	358.16	330.32	323.16	317.4	320.92	334.56	338.56
	Lado	CA	37.92	16	36.96	28.96	67.16	38.88	40	32.96	39.44	55.16	67.16	60.68	41.92	56.96	62.88
	2	CO	362.08	377.28	357.4	357.28	330.24	356.4	349.16	360.48	356.64	337.24	325.8	333.84	353.36	336.84	329.84
2	Lado	CA	88.4	82.88	101.64	87.16	109.92	122.2	128.96	141.92	160.68	153.92	140.4	129.92	132.4	140.4	145.92
	1	CO	308	296.2	294.36	297.8	279	267.16	258.68	245.72	222.72	229.84	242.24	241.44	253.36	249.44	242.56
	Lado	CA	43.16	92.4	128.68	97.64	129.92	113.92	121.64	114.88	113.64	143.72	114.48	106.88	111.44	117.92	112.96
	2	CO	356.84	276	261.72	296.4	258.68	274.28	261.24	275.92	269.4	243.4	272.52	280.4	285.84	271	274.92
3	Lado	CA	62.88	76.68	81.64	100.96	83.44	87.72	120.68	140.96	131.44	132.68	112.96	103.44	106.88	110.88	115.72
	1	CO	337.12	297.44	301.24	289.08	305.64	301.12	264.92	246.6	253.96	248.4	269.84	287.68	286.24	279.04	271.16
	Lado	CA	89.64	84.96	88.68	80.68	42.48	60.4	113.64	115.16	143.16	136.96	101.92	108.68	115.16	113.92	118.88
	2	CO	309.15	284.28	289.84	306.6	342.76	330.68	274.28	271.36	246.56	251.48	285.44	278.24	275.48	273.96	269.24

																	Continuação...
	Lado	CA	14.2	23.44	29.92	22.2	31.16	43.16	81.92	68.96	40.68	60.4	72.68	68.4	81.92	60.4	66.48
4	1	CO	385.5	367.6	363.44	370.68	363.56	350.48	313.8	322.76	349	332.84	316.96	325	313.84	335.04	330.24
	Lado	CA	20	28.68	63.16	8.96	28.68	24.68	44.68	44.4	40.96	49.92	63.72	67.16	82.2	59.44	63.44
	2	CO	378.5	363.4	328.6	381.72	361.28	370.6	345.28	346.28	349.36	346.52	330.92	329.72	313.48	337.12	333.84
5	Lado	CA	57.92	20.4	4	11.16	21.92	42.88	69.64	49.92	58.88	90.88	95.16	90.2	80.68	88.68	76.4
	1	CO	340.88	371.12	392.64	384.4	364.4	355.04	317.12	345.8	332.64	303.28	301.84	304.84	314.56	302.44	316.84
	Lado	CA	48	17.64	14.2	12.4	31.44	53.92	60.68	60.96	60.96	80.68	80.96	83.44	88.96	91.16	71.44
	2	CO	351.1	376.28	381.28	380.6	365.8	337.28	326.76	332.84	335.48	313.32	314.48	310.56	305.64	305.96	323

\*1 – Tratamento contendo pólen de milho convencional (DKB 240) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% pólen de milho convencional;

2 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2;

3 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO2) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS;

4 – Tratamento sem pólen de milho – 60% de xarope de açúcar invertido + 20% de proteína de soja texturizada (PTS) + 20% de extrato de levedura de cerveja;

5 – Tratamento controle – sem fornecimento de alimento artificial, contando apenas com a flora apícola disponível nos arredores do apiário



## ANEXO 3

Áreas de cria aberta em cm<sup>2</sup>, de abelhas africanizadas, *A. mellifera*, submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a julho de 2014. Cidade das Abelhas, Florianópolis- SC, 2013 e 2014.

TRATA- MENTOS*	Período avaliado														
	2013						2014								
	01 nov	19 nov	07 Dez	26 dez	13 jan	31 jan	18 Fev	08 mar	26 mar	13 abr	01 mai	19 mai	06 jun	24 jun	12 jul
1	70.6	25.24	93.08	64.4	115.8	82.6	80.68	76.12	75.84	115.8	142.6	137.0	116.1	120.1	116.8
2	131.5	175.2	230.3	184.8	239.8	236.1	250.6	256.8	274.3	297.6	254.8	236.8	243.8	258.3	258.8
3	152.5	161.6	170.3	181.6	125.9	148.1	234.3	256.1	274.6	269.6	214.8	212.1	222.0	224.8	234.6
4	34.2	52.12	93.08	31.16	59.84	67.84	126.6	113.3	81.64	110.3	136.4	135.5	164.1	119.8	129.9
5	105.9	38.04	18.2	23.56	53.36	96.8	130.3	110.8	119.8	171.5	176.1	173.6	169.6	179.8	147.8

\* 1 – Tratamento contendo pólen de milho convencional (DKB 240) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% pólen de milho convencional;

2 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2;

3 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO2) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS;

4 – Tratamento sem pólen de milho – 60% de xarope de açúcar invertido + 20% de proteína texturizada de soja (PTS) + 20% de extrato de levedura de cerveja (ELC);

5 – Tratamento controle – sem fornecimento de alimento artificial, contando apenas com a flora apícola disponível nos arredores do apiário.

## ANEXO 4

Áreas de cria fechada em cm<sup>2</sup>, de abelhas africanizadas, *A. mellifera*, submetidas a cinco tratamentos no período de novembro de 2013 a agosto de 2014. Cidade das Abelhas, Florianópolis- SC, 2013 e 2014.

TRATAMENTOS*	Períodos avaliados														
	2013					2014									
	01 nov	19 nov	07 dez	26 dez	13 jan	31 jan	18 fev	08 mar	26 mar	13 abr	01 mai	19 mai	06 jun	24 jun	12 jul
Pólen milho Convencional	729,1	761,9	694,1	716,2	675,2	710,2	699,4	712,4	714,8	667,5	648,9	651,2	674,3	671,4	668,4
Pólen evento VT PRO	664,8	572,2	556,1	594,2	537,7	541,4	519,9	521,6	492,1	473,2	514,7	521,8	539,2	520,4	517,5
Pólen evento VT PRO 2	646,2	581,7	591,1	595,7	648,4	631,8	539,2	517,9	500,5	499,8	555,3	565,9	561,7	553,0	540,4
PTS + ELC	764	731	692,0	752,4	724,8	721,1	659,1	669,0	698,3	679,3	647,9	654,7	627,3	672,1	664,1
Florada disponível	691,9	747,4	773,9	765,0	730,2	692,3	643,9	678,6	668,1	616,6	616,3	615,4	620,2	608,4	639,8

\* 1 – Tratamento contendo pólen de milho convencional (DKB 240) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% pólen de milho convencional;

2 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2;

3 – Tratamento contendo pólen de milho transgênico (DKB 240 VT PRO2) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS;

4 – Tratamento sem pólen de milho – 60% de xarope de açúcar invertido + 20% de proteína texturizada de soja (PTS) + 20% de extrato de levedura de cerveja (ELC);

5 – Tratamento controle – sem fornecimento de alimento artificial, contando apenas com a flora apícola disponível nos arredores do apiário.

