



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Adriana Chaves

Efeitos subletais de fungicidas usados no cultivo da macieira sobre colmeias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

Florianópolis

2022

Adriana Chaves

Efeitos subletais de fungicidas usados no cultivo da macieira sobre colmeias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestre em ciências

Orientador: Dr. Rubens Onofre Nodari

Coorientadora: Dra. Márcia Regina Fanta

Florianópolis

2022

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

Chaves, Adriana

Efeitos subletais de fungicidas usados no cultivo da
macieira sobre colmeias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758
(Hymenoptera: Apidae) / Adriana Chaves ; orientador,
Rubens Onofre Nodari, coorientador, Márcia Regina Fanta,
2022.

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Glândula
hipofaringea . 3. Geleia real. 4. Força das colmeias. 5.
Abelhas africanizadas. I. Onofre Nodari, Rubens . II.
Regina Fanta, Márcia. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

Adriana Chaves

**Título: Efeitos subletais de fungicidas usados no cultivo da macieira sobre colmeias de
Apis mellifera Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Michele Potrich

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. André Amarildo Sezerino

Epagri: Estação Experimental Regional de Caçador/SC

Prof. Dr. Alex Sandro Poltronieri

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Orientador

Florianópolis, 2022.

**Dedico este trabalho a todos que estiveram
comigo nesta jornada.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente:

Ao meu orientador e professor, Dr. Rubens Onofre Nodari, pela oportunidade que me foi concedida, pelo incentivo, pelos ensinamentos compartilhados e por toda a ajuda recebida neste percurso.

A minha coorientadora e amiga, Dr. Márcia Regina Faita, pela oportunidade, incentivo, pela parceria e ajuda irrestrita durante todo o processo.

Ao meu companheiro de vida, Guilherme, por todo o apoio, incentivo, paciência e amor recebidos sempre.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Centro de Ciências Agrárias (CCA), ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV), e as pessoas com eles envolvidas, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV - UFSC), através do professor Dr. Rubens Onofre Nodari e demais envolvidos; ao Laboratório de Entomologia Agrícola (LABENTO - UFSC), através dos professores Drs. Alex Sandro Poltronieri e César Assis Butignol; ao Parque Cidade das Abelhas (UFSC), através de todos os envolvidos e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME - UFSC), através da técnica Dra. Susane Lopes.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e demais apoio financeiro.

Por fim, sou grata aos meus colegas, Suelen Mattos, Letícia Gomes, Marcos Estevan e Dylan Thomas, principalmente pela ajuda nos trabalhos a campo.

Muito grata!

“O homem é parte da natureza e a sua guerra contra ela é, inevitavelmente, uma guerra contra si mesmo. Quanto mais claramente pudermos concentrar a nossa atenção nas maravilhas e realidades do universo sobre nós, menos gosto teremos pela destruição”.

(Rachel Carson)

RESUMO

A polinização é um serviço ecossistêmico de extrema importância em ambientes naturais e agrícolas. No entanto, a mortalidade de abelhas vem sendo relatada em todo o mundo, tendo como um dos agentes causadores, os agrotóxicos, gerando preocupação quanto seus efeitos sobre estes insetos. Alguns cultivos de interesse agrônômico são altamente dependentes da polinização de insetos, principalmente de abelhas. A espécie *Apis mellifera* é a mais utilizada nos serviços de polinização dirigida dos cultivos agrícolas, como é o caso das macieiras. Apesar disso, o uso intensivo de diversos agrotóxicos, incluindo fungicidas, é usual e frequente nesses ambientes. Estudos que buscam avaliar os efeitos subletais de fungicidas sobre organismos não alvo são escassos. Especificamente pesquisas a respeito de efeitos de fungicidas sobre a geleia real, substância proteica sintetizada nas glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrízes, produto essencial para a alimentação de todos os indivíduos da colmeia especialmente para a rainha, são inexistentes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de doses de campo de dois fungicidas (Captan[®] e Zignal[®]) isolados e em mistura sobre as glândulas hipofaríngeas, produção de geleia real e a interferência na força das colmeias. Para isso, foram utilizadas três colmeias com dez quadros cada por tratamento, análises de microscopia eletrônica de transmissão foram efetuadas nas glândulas e avaliados por seis meses, o número de quadros com: abelhas adultas, cria aberta e fechada, e alimento estocado. Nossos resultados revelaram que a exposição das abelhas aos fungicidas isolados e em mistura, promove alterações na ultraestrutura das glândulas hipofaríngeas, causando alterações morfológicas e estruturais nas mitocôndrias desses insetos. A degeneração precoce do retículo endoplasmático rugoso também foi verificada. Além disso, o citoplasma se mostrou heterogêneo e eletrondenso. As células dos núcleos não sofreram alterações, independentemente dos tratamentos. A exposição das abelhas aos fungicidas também ocasionou prejuízos para a força das colmeias, com redução da população de abelhas adultas, de cria aberta, de cria fechada e de alimento armazenado. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas nos parâmetros avaliados sobre a produção de geleia real.

Palavras chaves: Abelhas africanizadas. Captan[®]. Zignal[®]. Ultraestrutura. Geleia real. Força da colmeia.

ABSTRACT

Pollination is an extremely important ecosystem service in natural and agricultural environments. However, bee mortality has been reported around the world, with pesticides as one of the causative agents, raising concern about their effects on these insects. Some crops of agronomic interest are highly dependent on insect pollination, especially bees. The species *Apis mellifera* is the most used in the services of directed pollination of agricultural crops, as is the case of apple trees. Even so, the intensive use of several pesticides, including fungicides, is usual and frequent in these environments. Studies that seek to evaluate the sublethal effects of fungicides on non-target organisms are scarce. Specifically, regarding the effects of fungicides on royal jelly, a protein substance synthesized in the hypopharyngeal glands of nursing bees, an essential product for the food of all individuals in the hive, especially the queen, are non-existent. That said, the objective of the present study was to evaluate the effect of sublethal doses of two fungicides (Captan[®] and Zignal[®]) isolated and in mixture on the hypopharyngeal glands, royal jelly production and the interference in the strength of the hives. Thus, three hives with ten frames each per treatment were used, transmission electron microscopy analyzes were performed on the glands and evaluated for six months, the number of frames with: adult bees, open and closed brood, and stored food. Our results revealed that the exposure of bees to fungicides alone and in mixture, promotes changes in the ultrastructure of the hypopharyngeal glands, causing morphological and structural changes in the mitochondria of these insects. Early degeneration of the rough endoplasmic reticulum was also observed. In addition, the cytoplasm was heterogeneous and electron-dense. The cells of the nuclei did not suffer alterations, independent of the treatments. The exposure of bees to fungicides also caused damage to the strength of the hives, with a reduction in the population of adult bees, open brood, closed brood and stored food. No significant statistical differences were detected in the parameters evaluated on the production of royal jelly.

Keywords: Africanized bees. Captan[®]. Zignal[®]. Ultrastructure. Royal jelly. Hive strength.

LISTA DE FIGURAS

CONTEXTUALIZAÇÃO

- Figura 1** - Importância dos polinizadores, em especial das abelhas para os cultivos agrícolas. A: demonstração da porcentagem de cultivos polinizados por cada grupo de polinizador, com ênfase para as abelhas (78,9%). B: gráfico mostrando a porcentagem de polinizadores por grupo, sendo as abelhas, os polinizadores com maior riqueza. Adaptado do Relatório Temático e Sumário para Tomadores de Decisão – Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos - BPBES (2019)..... 22
- Figura 2** - Colmeia de *Apis mellifera* utilizada no sistema de polinização dirigida do cultivo de macieiras. Foto: André Sezerino (2019).....23
- Figura 3** - Esquema demonstrando os distintos sexos e castas presentes em *Apis mellifera*. Fonte: Peruquetti, R.C. Introdução ao estudo sobre abelhas. Disponível em: <http://www.ufac.br/ppgespa/polen>..... 24
- Figura 4** - Esquema da cabeça de *Apis mellifera*, com enfoque na localização e morfologia das glândulas hipofaríngeas. Adaptado de Macedo (2009).....25
- Figura 5** - Cúpulas artificiais contendo geleia real e larvas de *Apis mellifera*. Fonte: Chaves et al. (2020).....26

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* com **sete dias após a emergência**, expostas à alimentação com diferentes tratamentos, sendo: 1A - 1C - controle; 2A – 2C - Captan[®]; 3A – 3C - Zignal[®]; e 4A – 4C - Mix (Captan[®]+Zignal[®]). Mitocôndrias de abelhas alimentadas com Captan[®], apresentando formato de rosca (anelar), membranas externas e internas não preservadas e interior com cristas mitocondriais vacuolizadas (2B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas espaçadas e descontínuas, com citoplasma de aspecto heterogêneo e fragmentado (2C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Mix, demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólúcido (4B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas com espaçamento anormal e citoplasma heterogêneo (4C). Estas alterações das mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, não foram observadas nas abelhas do grupo controle e Zignal[®] e nos núcleos de todos os tratamentos. Legenda: Núcleo (N); Nucléolos (Nu); Membrana nuclear (Mn); Mitocôndria (M); Cristas mitocondriais (Cm);

Membrana externa e interna (Mei); Retículo endoplasmático rugoso (Rer); Cisterna (C); Ribossomos (R); e Complexo de golgi (CG).....34

Figura 2. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* com **15 dias após a emergência**, expostas à alimentação com diferentes tratamentos, sendo: 1A - 1C - controle; 2A – 2C - Captan[®]; 3A – 3C - Zignal[®]; e 4A – 4C - Mix (Captan[®]+Zignal[®]). Mitocôndrias de abelhas alimentadas com Captan[®], apresentando formato de rosca, membranas externas e internas não preservadas e interior vacuolizado (2B); retículo endoplasmático rugoso com ausência de cisternas normais e citoplasma eletrondenso (2C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Zignal[®], demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólúcido (3B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas espaçadas e citoplasma com aspecto heterogêneo e eletrondenso (3C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Mix, demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólúcido (4B); retículo endoplasmático rugoso com ausência de cisternas normais e citoplasma eletrondenso (4C). Estas alterações das mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, não foram observadas nas abelhas do grupo controle e nos núcleos de todos os tratamentos. Legenda: Núcleo (N); Nucléolos (Nu); Membrana nuclear (Mn); Mitocôndria (M); Cristas mitocondriais (Cm); Membrana externa e interna (Mei); Retículo endoplasmático rugoso (Rer); Cisterna (C); Ribossomos (R); e Complexo de golgi (CG).....35

Figura 3. Glândulas hipofaríngeas de abelhas com 15 dias após a emergência. A: glândula de abelha operária pertencente ao grupo controle. B: glândula de abelha operária pertencente ao grupo Mix, apresentando ácidos deformados com aspecto gelatinoso e turbido. Imagens registradas em Lupa Opticam. Fonte: CHAVES, 2021.....39

Figura 4. Médias e erro padrão (linha no final das barras) dos componentes da força das colmeias (número de quadros: com abelhas adultas, cria aberta, cria fechada e com alimento), expostas aos tratamentos (Ctrl = controle, Zig = Zignal[®], Cap = Captan[®] e Mix = Zig + Cap), em quatro momentos distintos (antes, 45 dias após, quatro meses e meio após e seis meses após a exposição). Os histogramas foram produzidos no Excel 2019.....43

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Tabela 1.** Valores médios dos três ciclos de produção, de peso total e por cúpula da geleia real e número de larvas aceitas em colmeias expostas aos tratamentos: controle, Zignal[®], Captan[®] e Mix.....40
- Tabela 2.** Comparação dos quatro componentes de força das colmeias avaliados (número de quadros com abelhas adultas; número de quadros com cria aberta; número de quadros com cria fechada e número de quadros com alimento), entre os quatros tratamentos (Ctrl: Controle; Cap: Captan[®]; Zig: Zignal[®] e Mix: Zignal[®] + Captan[®]).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPM - Associação Brasileira de Produtores de Maçã

ANAVA - Análise de variância

ATP – Trifosfato de Adenosina

A mellifera - *Apis mellifera*

B.O.D - Equipamento com demanda bioquímica de oxigênio

C - Cisternas

Cap - Tratamento utilizando o fungicida Captan

CG - Complexo de golgi

Ctrl - Tratamento controle, sem utilização de fungicidas

Cm - Cristas mitocondriais

°C - Graus Celsius

Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

g - Gramas

h - Horas

i.a. - Ingrediente ativo

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Km - Quilômetros

Kv - Kilovolts

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

M - Molar

M - Mitocôndrias

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

mL - Mililitros

Mix - Tratamento utilizando mistura dos fungicidas Zignal e Captan

Mn - Membrana nuclear

Mei - Membranas externas e internas

N - Núcleo

Nu - Nucléolo

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

μL - Microlitros

μm - Micrometro

R - Ribossomos

Rer - Retículo endoplasmático rugoso

ROS - Espécie reativa de oxigênio

Zig - Tratamento utilizando o fungicida Zignal

Sumário

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 ANTECEDENTES	17
3.1 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE ABELHAS.....	17
3.2 EFEITOS DE FUNGICIDAS SOBRE ABELHAS	17
3.3 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS	18
3.4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A GELEIA REAL	19
3.5 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A FORÇA DA COLMEIA.....	20
4 CONTEXTUALIZAÇÃO	20
4.1 MACIEIRA, IMPORTÂNCIA E DEPENDÊNCIA DE POLINIZAÇÃO.....	20
4.2 POLINIZADORES, ABELHAS, IMPORTÂNCIA E A POLINIZAÇÃO DIRIGIDA	21
4.3 ABELHAS AFRICANIZADAS <i>Apis mellifera</i>	23
4.4 GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS E GELEIA REAL.....	24
4.5 GELEIA REAL, NUTRIÇÃO E SAÚDE DAS COLMEIAS	26
4.6 AGROTÓXICOS / FUNGICIDAS	27
4.7 USO DE AGROTÓXICOS / FUNGICIDAS NO CULTIVO DA MACIEIRA.....	27
4.8 EXPOSIÇÃO DAS ABELHAS AOS AGROTÓXICOS E CONSEQUÊNCIAS.....	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO BIOENSAIO E PADRONIZAÇÃO DE COLMEIAS	29
5.2 FUNGICIDAS UTILIZADOS NO BIOENSAIO.....	29
5.3 EXPOSIÇÃO DAS COLMEIAS AOS FUNGICIDAS	30
5.4 ANÁLISE DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS.....	30
5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL	31
5.6 AVALIAÇÃO DA FORÇA DAS COLMEIAS.....	32
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 ULTRAESTRUTURAS DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS.....	33
6.2 PRODUÇÃO DE GELEIA REAL.....	40
6.3 FORÇA DAS COLMEIAS	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8 CONCLUSÕES	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O cultivo de macieiras é importante para as regiões onde é produzida, para os agricultores que dependem dela para subsistência e como fonte de alimento nutritivo e saboroso para os consumidores (IBGE, 2020). A cadeia produtiva da macieira tem relevante função sócio-econômica por envolver um número grande de trabalhadores (148 mil empregos) e gerar renda para o Brasil, particularmente para Santa Catarina, o principal estado produtor de maçã (ABPM, 2020). No processo produtivo da fruta são utilizadas frequentes pulverizações de agrotóxicos, incluindo fungicidas. Estes produtos são utilizados como forma de tentar suprimir a incidência de pragas e doenças para as quais as variedades de macieira são suscetíveis (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2008).

Por apresentarem autoincompatibilidade gametofítica, as variedades cultivadas de macieira requerem polinização cruzada com pólen produzido por outras variedades. Esta polinização é mediada por polinizadores, que são de baixa frequência nas regiões produtoras de maçã em Santa Catarina. Especificamente nas macieiras, a ausência de polinizadores pode reduzir a produção em 90% - 100% (DELAPLANE e MAYER, 2000). É por esta razão que os fruticultores alocam colmeias de *Apis mellifera* nos pomares durante o florescimento da cultura (VIEIRA et al., 2004; PATRON, 2010).

No Brasil, o cultivo de macieiras é o que mais movimenta abelhas para a polinização dirigida. Estima-se que sejam utilizadas em torno de 100.000 colmeias durante o período de floração do cultivo (FREITAS e NUNES-SILVA, 2012). Com isso, as abelhas podem ser expostas de forma direta aos agrotóxicos pulverizados durante a fase de florescimento (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014; SGOLASTRA et al., 2019) ou, indireta, no caso de produtos sistêmicos, devido a resíduos presentes nos tecidos das plantas existentes na área de cultivo decorrentes de pulverizações prévias ao florescimento. Assim, as abelhas são expostas de forma contínua a múltiplos agrotóxicos (BOTÍAS et al., 2017).

Efeitos prejudiciais de agrotóxicos sobre abelhas são relatados por diversos estudos (DESNEUX et al., 2007; CALATAYUD-VERNICH et al., 2019), incluindo mortalidade (TOMÉ et al., 2017; TAVARES et al., 2017; DO PRADO et al., 2020). Os referidos efeitos podem comprometer a manutenção dos ecossistemas agrícolas e naturais, assim como o comércio de produtos apícolas e, conseqüentemente, afetar a economia. Agrotóxicos também exercem influência sobre as glândulas hipofaríngeas, relacionadas com a produção de geleia real (ZALUSKI et al., 2017; FAITA et al., 2018) e na quantidade de geleia real produzida (CHAVES et al., 2020).

A geleia real é uma substância sintetizadas através das glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas (DESEYN e BILLEN, 2005; LIU et al., 2008) para ser alimento de todos os indivíduos da colmeia em algum momento do seu desenvolvimento e exclusivo da rainha por toda a vida (HAYDAK, 1970), sendo também responsável por promover suas características especiais (ALBARRACÍN et al., 2006; WANG et al., 2016). Além de servir como nutrição, a geleia real desempenha papel importante na imunidade das abelhas contra doenças e patógenos (BLUM et al., 1959; NEGRI et al., 2019).

A busca simples do tema “pesticide effects on bees” no “google scholar” em 27 de novembro de 2021 localizou 69.800 documentos. A análise de parte destes documentos indica que o assunto é reconhecido, tanto pela comunidade científica, quanto em políticas públicas. Embora as abelhas sejam insetos, os estudos demonstraram efeitos adversos sobre elas, tanto de inseticidas, como de fungicidas e herbicidas.

No entanto, estudos que buscam conhecer os efeitos de fungicidas e demais agrotóxicos utilizados nos pomares de macieira, em particular, sobre a dinâmica e sobrevivência das colmeias são escassos. Este cenário justifica intensificar esforços para melhor compreender os efeitos desses produtos sobre as abelhas e buscar um equilíbrio entre a produção das frutas e a preservação desses insetos e, conseqüentemente, da biodiversidade e segurança alimentar. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo investigar efeitos de doses de campo de dois fungicidas utilizados no cultivo da macieira: Zignal[®] (i.a. Fluazinam) e Captan SC[®] (i.a. Captana), isolados e em mistura, sobre as glândulas hipofaríngeas, a produção de geleia real e força das colmeias de abelhas da espécie *A. mellifera* utilizadas na polinização dirigida de pomares de macieiras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de doses de campo de dois fungicidas usados no cultivo da macieira, Zignal[®] e Captan SC[®], isolados e em mistura, sobre as glândulas hipofaríngeas, produção de geleia real e força das colmeias de *A. mellifera*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da ingestão de doses de campo dos fungicidas na ultraestrutura das glândulas hipofaríngeas de operárias adultas de *A. mellifera*;

2. Mensurar o efeito da ingestão de doses de campo de fungicidas sobre aspectos relacionados com produção de geleia real;

3. Avaliar os efeitos que os fungicidas podem causar nos parâmetros da força das colmeias de *A. mellifera* expostas a doses de campo dos fungicidas.

3 ANTECEDENTES

3.1 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE ABELHAS

Os efeitos prejudiciais de agrotóxicos sobre abelhas são muitos. Os danos incluem crescimento desigual, mudanças comportamentais, redução da fertilidade e longevidade nas rainhas (DESNEUX et al., 2007), redução no número de larvas, na absorção de alimentos e na capacidade de substituição nas rainhas (SANDROCK et al., 2014).

Outros efeitos relatados incluem: intoxicação (CALATAYUD-VERNICH et al., 2019); mortalidade de larvas (TAVARES et al., 2017); alteração da expressão gênica (WU et al., 2017); imunidade reduzida (DESNEUX et al., 2007; DI PRISCO et al., 2013); menor capacidade de aprendizagem (DECOURTYE et al., 2003); redução do forrageamento (DECOURTYE et al., 2004).

3.2 EFEITOS DE FUNGICIDAS SOBRE ABELHAS

Geralmente se assume que fungicidas não afetam abelhas, pois não são seu alvo de ação no ponto de vista agrônomo. No entanto, Pettis et al. (2013) relataram que a exposição das abelhas aos fungicidas pode torná-las mais suscetíveis a patógenos como o parasita intestinal *Nosema ceranae*. Neste sentido, Domingues et al. (2020) demonstraram que a exposição crônica das abelhas ao ingrediente ativo piraclostrobina alterou a morfofisiologia do intestino médio das forrageiras e reduz a rotulagem de polissacarídeos no intestino de abelhas jovens. Igualmente, Batista et al. (2020) relatam que a piraclostrobina afeta o intestino médio de abelhas.

A ingestão de fungicidas também causa toxicidade direta para as abelhas adultas de *A. mellifera* (ZHU et al., 2014) e para abelhas solitárias, sendo que o fungicida Captan[®] limitou drasticamente a sobrevivência da abelha azul (LADURNER et al., 2005). Além disso, interfere na capacidade de desintoxicação das abelhas (BERENBAUM e JOHNSON, 2015), pois causa alterações nas expressões gênicas de enzimas de desintoxicação (TOMÉ et al., 2020). Também foi demonstrada a relação entre a presença de fungicidas com o baixo desenvolvimento de

colmeias (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2013; SIMON-DELSO et al., 2014; BERNAUER et al., 2015; TRAYNOR et al., 2016; MCART et al., 2017) e com aparecimento de distúrbios das colônias (SIMON-DELSO et al., 2014).

Do Prado et al. (2020) demonstraram que a exposição de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* ao difenoconazol (i.a.) causou mortalidade, assim como acúmulo deste produto nos tecidos dos insetos. Adicionalmente, Leite et al. (2018) relataram baixa sobrevivência em abelhas *A. mellifera* expostas por via de contato ao difenoconazol (i.a.), com observação de alterações comportamentais adversas, como agitação e mudanças na coordenação motora. Alterações comportamentais igualmente foram relatadas por Tadei et al. (2019) em abelhas que ingeriram piraclostrobina (i.a.). O fungicida Pristie[®] (ingredientes ativos: boscalide e piraclostrobina) reduziu a capacidade de aprendizagem, principalmente de forrageiras de *Apis mellifera* (DESJARDINS et al., 2021). A sobrevivência de abelhas africanizadas foi reduzida quando expostas a doses baixas de piraclostrobina, também houve sobre carregamento do sistema hepato-nefrocítico das abelhas que ingeriram o ingrediente ativo (DOMINGUES et al., 2017-2020). Redução de sobrevivência de *A. mellifera* também foi demonstrada por Fisher et al. (2017) quando expuseram as abelhas a misturas de tanque contendo diversos fungicidas. A mistura de dois ingredientes ativos, tiofanato-metílico + clorotalonil causou toxicidade em abelhas *A. mellifera* e *Partamona helleri*, com alta taxa de mortalidade (TOMÉ et al., 2017).

Fungicidas ainda impactam no metabolismo energético de abelhas, com consequente redução de forrageamento (PRADO et al., 2019; LIAO et al., 2019). Complementarmente, a piraclostrobina afeta negativamente as funções mitocondriais de abelhas melíferas, demonstrando inibição da fosforilação oxidativa e respiração celular. Além disso, promoveu declínio no potencial da membrana mitocondrial e na síntese de ATP (trifosfato de adenosina), o que é crítico para a atividade de voo das abelhas no momento do forrageamento (NICODEMO, 2020). Zaluski et al. (2020) relataram que a exposição de abelhas nutrízes ao ingrediente ativo piraclostrobina e ao inseticida Fipronil[®] diminuiu a expressão de quatro proteínas da geleia real (MRJP1, MRJP2, MRJP4 e MRJP5). Por fim, pesquisas mostraram que fungicidas podem reduzir a emergência de rainhas (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2013; DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015).

3.3 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS

Estudos que avaliam os efeitos adversos de agrotóxicos sobre as glândulas hipofaringeanas de abelhas são escassos. Contudo, foram observadas alterações ultraestruturais

nas células das glândulas de *A. mellifera* que ingeriram alimento contendo resíduos de Roundup® (i.a. glifosato). Essas alterações incluem danos às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático rugoso, a principal estrutura relacionada à síntese de proteínas nas células (FAITA et al., 2018). Em conformidade, a exposição de abelhas nutrizas a doses de campo de piraclostrobina e o inseticida Fipronil®, causaram alterações morfológicas na região mandibular e glândulas hipofaríngeas das abelhas (ZALUSKI et al., 2017), sugerindo um possível comprometimento da produção e qualidade da geleia real (ZALUSKI et al., 2017; FAITA et al., 2018).

Ainda segundo Berenbaum e Liao (2019), o tamanho, a morfologia e a atividade da glândula hipofaríngea são afetados por diversos agrotóxicos, incluindo fungicidas. Portanto, podem afetar a qualidade da alimentação das larvas e rainha de duas formas: 1 - alterando a função das glândulas, que são responsáveis pela produção de geleia real, reduzindo assim a quantidade e qualidade deste alimento, e 2 - alterando a frequência, duração e qualidade do comportamento de enfermagem. Adicionalmente, inseticidas neonicotinóides utilizados nos cultivos agrícolas, e acaricidas utilizados nas colmeias, causam morte celular das glândulas de abelhas, reduzindo o tamanho dos ácinos glandulares (ALAUX et al., 2010; SKERL e GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013).

3.4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A GELEIA REAL

Há uma escassez de trabalhos avaliando efeitos de agrotóxicos sobre a geleia real. No entanto, Zaluski et al. (2020) mostraram que a exposição de abelhas nutrizas ao fungicida piraclostrobina e inseticida Fipronil® reduziu a expressão de quatro proteínas da geleia real (MRJP1, MRJP2, MRJP4 e MRJP5), assim como de diversas proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, síntese de energia, sistema antioxidante, desintoxicação, biossíntese, transcrição e tradução, dobramento e ligação de proteínas, olfato, aprendizagem e memória. Relatam ainda que quando os dois produtos foram misturados, as mudanças na expressão das proteínas foram aumentadas. Similarmente, Faíta et al. (2022), verificaram que na geleia real produzida nas colmeias que receberam alimentação contendo Roundup®, a proteína (MRJP3) foi regulada negativamente.

Chaves et al. (2020), constataram uma redução da geleia real produzida por *A. mellifera* expostas a doses subletais do herbicida Roundup®. Por fim, houve redução na composição lipídica e na atividade antimicrobiana contra a bactéria *Vibrio fischeri* na geleia real produzida por abelhas expostas ao inseticida clotianidina (SCHOTT et al., 2021).

3.5 EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A FORÇA DA COLMEIA

Estudos voltados a avaliar os efeitos de agrotóxicos sobre a força da colmeia também são escassos. Contudo, Sandrock et al. (2014) expuseram cronicamente colônias de abelhas a dois neonicotinóides (a base de tiametoxame e clotianidina) e demonstraram que depois de dois ciclos de cria (1,5 meses) elas tiveram desempenho comprometido: com redução de número de abelhas adultas, de ninhada, de produção de mel e de pólen armazenado (forrageamento), sendo que os impactos dessa exposição podem enfraquecer a colônia a longo prazo. Não obstante, mencionam que é preciso levar em conta a importância da base genética de susceptibilidade aos neonicotinóides em abelhas, que pode variar consideravelmente. Liao et al. (2019) verificaram que a ingestão do ingrediente ativo boscalide reduziu a frequência de batidas de asas de abelhas forrageiras durante o vôo. Ao nível da colônia, a ingestão desse fungicida pode afetar a saúde geral da colônia, reduzindo a eficiência do forrageamento.

4 CONTEXTUALIZAÇÃO

4.1 MACIEIRA, IMPORTÂNCIA E DEPENDÊNCIA DE POLINIZAÇÃO

A macieira pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoidae e gênero *Malus* (WATKINS, 1995). É uma fruta com elevado valor nutracêutico e um dos destaques do agronegócio Catarinense (ABPM, 2020). Santa Catarina possui atualmente 2.992 produtores de maçãs e as principais variedades produzidas são a Gala e a Fuji (IBGE, 2020). Uma pesquisa realizada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) indicou que em 2018, dos principais estados produtores do Sul do Brasil, Santa Catarina foi líder de produção com 52,6%. A produção total da fruta no Estado atingiu 567.951 toneladas no mesmo ano com uma projeção de 578 mil toneladas para 2020 (IBGE, 2018).

O Brasil é um dos principais produtores de maçãs do cenário mundial e, com contribuição expressiva de Santa Catarina, teve um crescimento das exportações de maçã em 2018, exportando para 66 países (KIST et al., 2019). Conforme cálculo realizado pela Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM), o setor proporciona um dos maiores índices de demanda de mão de obra no agronegócio brasileiro, atingindo cerca de 1,5 emprego/ha. Assim, a cadeia produtiva da maçã oferece trabalho direto para mais de 49 mil pessoas e 98 mil indiretos, configurando 148 mil empregos. Além disso, o cultivo da maçã

viabiliza economicamente pequenas propriedades e incrementa a agroindústria, explorando muito bem as condições climáticas dos estados onde é produzida (BITTENCURT, 2011), proporcionando desenvolvimento destas regiões (KOVALESKI e dos SANTOS, 2012).

Para suprir a crescente demanda de produção da fruta faz-se necessário melhorar a qualidade e a produtividade do cultivo (PATRON, 2010). A obtenção de altos rendimentos das macieiras depende de uma ótima frutificação, que requer entre outros fatores, da fertilização das suas flores, conseqüentemente de uma polinização satisfatória (VIEIRA et al., 2004). A falta de polinizadores pode comprometer as produções agrícolas, especificamente nas macieiras pode reduzir a produção em 90% - 100% (DELAPLANE e MAYER, 2000). Problemas relacionados à polinização e à fecundação das flores da espécie também podem reduzir a qualidade dos frutos devido a diminuição do número de sementes formadas por fruto (KEULEMANS et al., 1996; BREEZE, 2011).

Adicionalmente, em cultivares de macieira com alto grau de incompatibilidade torna-se necessário o plantio simultâneo de duas ou mais variedades para que ocorra a polinização cruzada (SOSTER e LATORRE, 2007), o que faz os serviços de polinização ainda mais indispensáveis para a produção dos frutos (VIANA et al., 2015).

4.2 POLINIZADORES, ABELHAS, IMPORTÂNCIA E A POLINIZAÇÃO DIRIGIDA

Os insetos em geral possuem importância nos serviços de polinização, em especial as abelhas (Figura 1), que são consideradas os polinizadores com maior relevância (MALERBO-SOUZA e HALAK, 2009). As abelhas representam um dos maiores grupos da Ordem Hymenoptera (MICHENER, 2000). O serviço de polinização prestado por abelhas é essencial para a manutenção dos ecossistemas agrícolas e naturais (IMPERATRIZ FONSECA; NUNES-SILVA, 2010). Nos ecossistemas naturais, os efeitos da falta de polinização são mais sutis do que em sistemas agrícolas, mas as conseqüências podem ser muitas, como a extinção de espécies vegetais, diminuição da fauna que se alimenta de frutos e sementes destas plantas, regeneração insuficiente da flora, erosão do solo e redução dos volumes de água (EARDLEY et al., 2006).

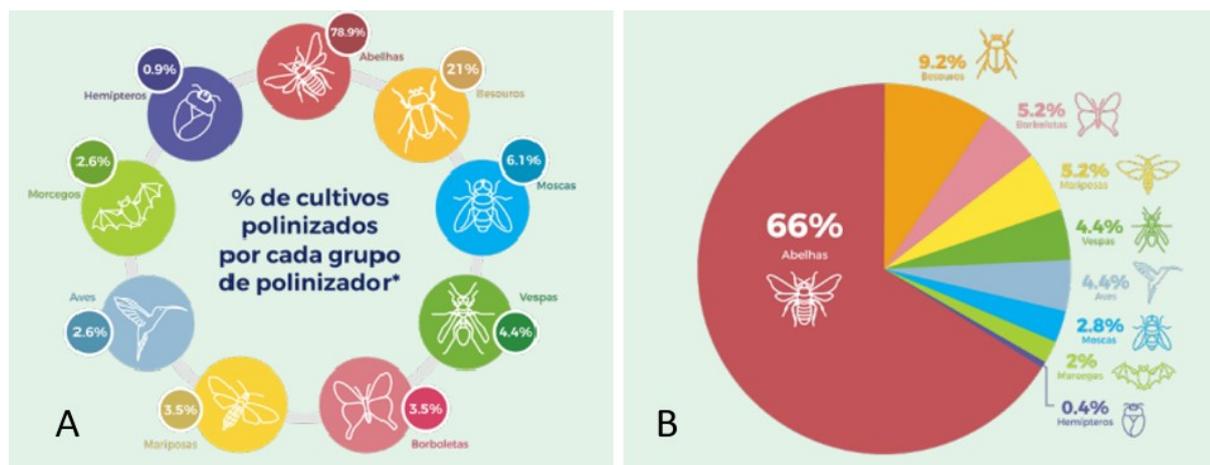


Figura 1 – Importância dos polinizadores, em especial das abelhas para os cultivos agrícolas. A: demonstração da porcentagem de cultivos polinizados por cada grupo de polinizador, com ênfase para as abelhas (78,9%). B: gráfico mostrando a porcentagem de polinizadores por grupo, sendo as abelhas, os polinizadores com maior riqueza. Adaptado do Relatório Temático e Sumário para Tomadores de Decisão – Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos - BPBES (2019).

A valoração econômica mundial da polinização realizada por insetos no ano de 2005 foi de aproximadamente 153 bilhões de euros, correspondendo por 9,5% do valor total da produção agrícola (GALLAI et al. 2009). No Brasil, a valoração anual da polinização dos cultivos agrícolas está estimada em 12 bilhões de dólares, ou seja, 26% do valor total da produção que é de 45 bilhões de dólares (GIANNINI et al., 2015).

Nas últimas décadas ocorreu um declínio de diversos polinizadores, devido entre outros fatores, à intensificação da produção agrícola caracterizada por grandes áreas de monoculturas, degradação de ambientes naturais, o que inclui a simplificação e fragmentação de paisagens, assim como o uso intensivo de agrotóxicos (FREITAS et al., 2009; MULLIN et al., 2010; CUNHA et al., 2014; GILBURN et al., 2015; FORISTER et al., 2016; NAKANISHI et al., 2018). Buscando compensar o déficit de polinização, produtores optam pela introdução de colmeias de abelhas no pomar para polinizar as flores de plantas de macieira (Figura 2), atividade conhecida por polinização dirigida (VIEIRA et al., 2004; PATRON, 2010).



Figura 2 - Colmeia de *Apis mellifera* utilizada no sistema de polinização dirigida do cultivo de macieiras. Foto: André Sezerino (2019).

As colmeias de *A. mellifera* se tornaram o principal agente dos serviços de polinização dirigida dos cultivos agrícolas e também da macieira, uma vez que essa espécie possui ampla dispersão geográfica, facilidade de manejo em colmeias e capacidade de visitar um número expressivo de flores em um só dia (PATRON, 2010). Desta forma, a espécie é considerada o principal polinizador de plantas cultivadas, gerando aumento da produtividade e qualidade de diversas culturas (POTTS et al., 2010; MOUGA et al., 2012; TOLEDO et al., 2013). Além disso, possuem valor na apicultura, proporcionando emprego e renda para apicultores que trabalham com a comercialização dos produtos produzidos por elas: mel, própolis, geleia real, apitoxina, pólen e cera.

4.3 ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera*

No Brasil, as abelhas melíferas com ferrão criadas em colmeias são abelhas poli híbridas africanizadas, resultantes dos acasalamentos naturais das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) com as alemãs (*Apis mellifera mellifera*), as italianas (*Apis mellifera ligustica*) e as

carníolas (*Apis mellifera carnica*) (GONÇALVES, 2006). Essas abelhas são insetos eusociais e suas colônias formam um superorganismo (SEELEY, 1982).

As colônias de abelhas africanizadas são constituídas por abelhas divididas em castas (Figura 3), com uma rainha, responsável pela oviposição e equilíbrio populacional, zangões que participam do voo nupcial e operárias (WIESE, 2005). As operárias, que são uma casta especializada (WRIGHT et al., 2018) e desempenham diversos trabalhos, sendo responsáveis pela nutrição de todos os indivíduos da colmeia (BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010). A rainha vive em média de 1 a 2 anos enquanto as operárias vivem de 15-38 dias no verão e até 150-200 dias no inverno (HSU et al., 2016). As operárias forrageiras coletam néctar, pólen e melato que serão convertidos em alimentos para consumo e reserva (WINSTON et al., 1979) e estes são fundamentais para a sobrevivência da colmeia (MARCHINI et al., 2006). A *A. mellifera* é única entre as espécies de abelhas, pois além de converter os alimentos que ingerem em mel, produz a geleia real (WRIGHT et al., 2018).

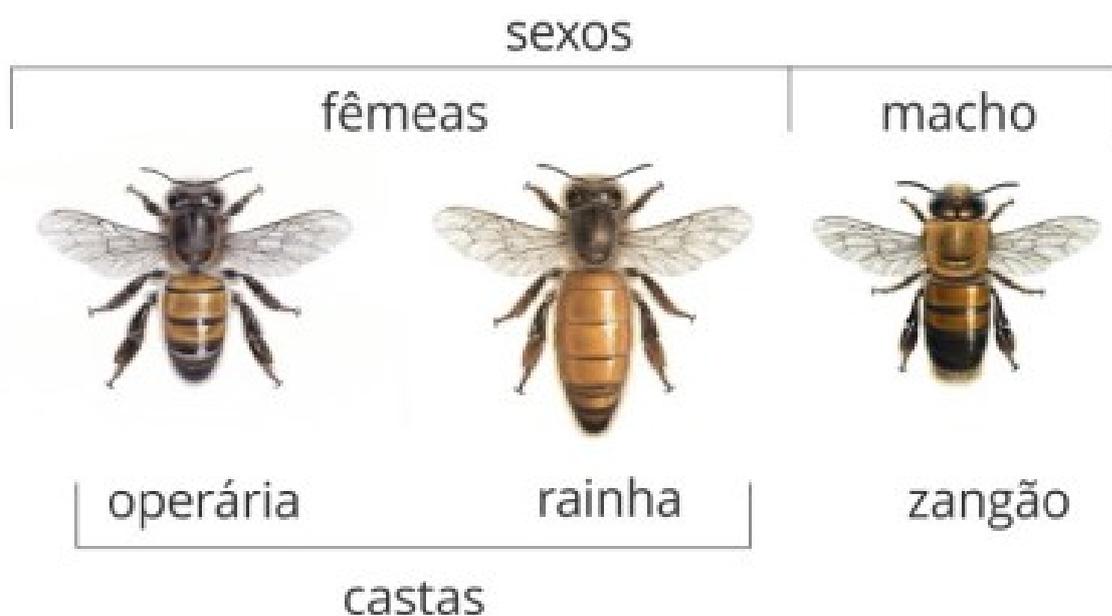


Figura 3 – Esquema demonstrando os distintos sexos e castas presentes em *Apis mellifera*. Fonte: Peruquetti, R.C. Introdução ao estudo sobre abelhas. Disponível em <http://www.ufac.br/ppgespa/polen>

4.4 GLÂNDULAS HIPOFARINGEAS E GELEIA REAL

As glândulas hipofaríngeas (Figura 4) são responsáveis pela síntese de enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen e estão localizadas na cabeça das abelhas operárias (HUANG et al., 1989). Morfologicamente apresentam-se como uma estrutura

em forma de cachos longos, com um canal central onde se ligam diversos ácinos secretores (MACEDO, 2009).

A geleia real (Figura 5) é uma substância cremosa sintetizada e secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas nutrízes (DESEYN e BILLEN, 2005; DIMOU et al., 2007; LIU et al., 2008) entre o quinto e o 15º dia de vida (TOLEDO et al., 2010), fase em que as glândulas possuem completo desenvolvimento (REMBOLD et al., 1974; CRAILSHEIM, 1991; HRASSNIGG e CRAILSHEIM, 1998). Esse produto é primordial para alimentação de todas as larvas até três dias, sendo o alimento exclusivo da rainha por toda a sua vida (HAYDAK, 1970). A geleia real é responsável pelas características exclusivas da rainha, como massa corporal aumentada, longevidade e desenvolvimento do aparelho reprodutivo (ALBARRACÍN et al., 2006; WANG et al., 2016), assim como pela diferenciação das castas dentro da colmeia (OHASHI et al., 1997; WRIGHT et al., 2018).

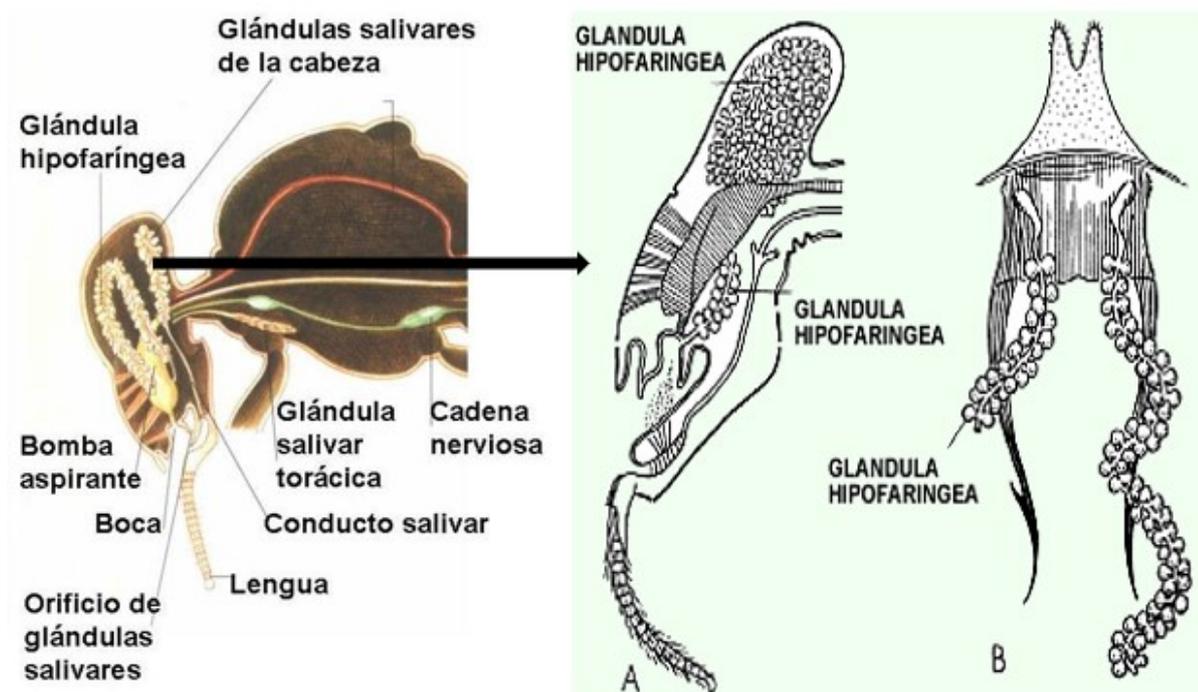


Figura 4 - Componentes da cabeça de *Apis mellifera*, com enfoque para a localização e morfologia das glândulas hipofaríngeas. Adaptado de Macedo (2009).



Figura 5 - Cúpulas de acrílico contendo geleia real e larvas de *Apis mellifera*. Fonte: CHAVES et al., 2020.

4.5 GELEIA REAL, NUTRIÇÃO E SAÚDE DAS COLMEIAS

Em média, a geleia real é constituída de água (63%), proteínas (14%), carboidratos (18%), gorduras (6%) (WRIGHT et al., 2018), traços minerais e vitaminas (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Também possui substâncias protetoras como a proteína royalisina (MCCLESKEY e MELAMPY, 1939), associada à imunidade social da colônia (CREMER et al. 2007) e o ácido 10-Hydrox-2-decenóico (10HDA), principal componente da fração lipídica da geleia real que apresenta atividade antibactericida e antifúngica (BLUM et al., 1959; KOSHIO e MURADIAN, 2003). A proteção oferecida por essas substâncias contra estressores, acontece quando as abelhas nutrizas através do processo de trofalaxia, compartilham a geleia com os outros indivíduos da colônia (NEGRI et al., 2019), oferecendo não só nutrição, mas também proteção contra patógenos a esses indivíduos (YANG et al., 2017).

A saúde das colônias de abelhas não é definida apenas pela ausência de doenças, mas também pela presença de indivíduos bem nutridos capazes de resistir a estressores. Colmeias utilizadas para a polinização dirigida de áreas agrícolas com monocultivos têm uma dieta pouco diversificada de pólen e néctar. Neste caso, as abelhas podem não obter todos os nutrientes necessários (BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010). Quando se fala em nutrição de abelhas, a alimentação das rainhas é um assunto extremamente relevante. Nesse sentido a geleia real assume o protagonismo (HAYDAK, 1943). Pois, uma colônia é reflexo de sua rainha, uma rainha bem nutrida, com alta capacidade de oviposição, resultará em uma colônia populosa e forte (BIENEFELD et al., 2007). A relação entre a nutrição e imunidade é reconhecida em vários organismos e as abelhas não são uma exceção (NEGRI et al., 2019). Portanto, uma

nutrição deficitária pode ocasionar a redução populacional da colmeia, comprometer o equilíbrio fisiológico e a resistência ao estresse das abelhas, aumentando sua vulnerabilidade a doenças e agrotóxicos (ARCHER et al., 2014).

4.6 AGROTÓXICOS / FUNGICIDAS

De forma geral os agrotóxicos são classificados quanto ao organismo alvo que pretendem atingir, podendo ser inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros (BHALLI et al., 2006). O Brasil é o país que mais utiliza agrotóxicos no mundo desde 2008 (CARNEIRO et al., 2015). Particularmente, fungicidas são produtos químicos utilizados para controlar o ataque de fungos em cultivos agrícolas, representando 11% do total de agrotóxicos consumidos no mundo (ZHANG 2018) e 17% dos dez ingredientes ativos mais utilizados no Brasil em 2019 (IBAMA, 2019).

4.7 USO DE AGROTÓXICOS / FUNGICIDAS NO CULTIVO DA MACIEIRA

A macieira é uma frutífera acometida por diversas pragas e doenças. Na maioria dos cultivos de fruta na forma convencional, a utilização de uma gama de agrotóxicos é usual, são utilizados principalmente fungicidas, inseticidas e acaricidas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2008). Dentre os fungicidas usados nos pomares de maçãs estão o Zignal[®] (i.a. fluazinam) e o Captan SC[®] (i.a. captana), que constam na grade de agrotóxicos com uso permitido para a produção integrada da maçã, ciclo 2020/2021. Estes fungicidas são também utilizados em outros cultivos como a soja, tomate e batata, para controlar uma grande quantidade de fungos fitopatogênicos, conforme indicado na bula do produto.

4.8 EXPOSIÇÃO DAS ABELHAS AOS AGROTÓXICOS E CONSEQUÊNCIAS

A exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre especialmente via contato ou ingestão de resíduos presentes no pólen e no néctar de plantas pulverizadas (KRUPKE et al., 2012; SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014; BOTÍAS et al., 2015; COWLES e EITZER, 2017), assim como em águas contaminadas (KOVAK et al., 2010). A exposição aos agrotóxicos via consumo de pólen e néctar em comparação com outras, como através de partículas do ar, é uma rota considerada de maior risco para as abelhas (BIRELEY et al., 2019; BOYLE et al., 2019; SGOLASTRA et al., 2019).

Devido a atividade de forrageamento, no mesmo momento que polinizam as flores das culturas, as abelhas são expostas aos agrotóxicos e os levam para a colmeia (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014; POQUET et al., 2016; KARISE et al., 2017; SGOLASTRA et al., 2019), sendo que os resíduos dos produtos podem permanecer ali por tempo indeterminado (GOULSON, 2013; BOYLE et al., 2019). Nas abelhas melíferas, os resíduos permanecem também na cera (EL AGREBI et al. 2019); assim, não só as abelhas forrageiras, mas os demais indivíduos da colmeia estão em risco de exposição aos agrotóxicos (PRADO et al., 2019). Além disso, em um cenário realista de campo, as abelhas são expostas de forma contínua a múltiplos agrotóxicos (LONG e KRUPKE, 2016; ZALUSKI et al., 2017; BOTÍAS et al., 2017). Essa exposição contínua a diversas toxinas é prejudicial para esses insetos (LAYCOCK e CRESSWELL, 2013). Mesmo expostas a baixas doses de misturas de agrotóxicos, as abelhas desenvolvem problemas a longo prazo. Por esta razão é importante examinar a toxicidade destas misturas em condições de campo (PRADO et al., 2019).

Misturas de resíduos de agrotóxicos podem resultar em toxicidade sinérgica para as abelhas (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014). A exposição simultânea a produtos químicos, mesmo em doses baixas, pode tornar-se letal quando, por exemplo, as abelhas são expostas a essa mistura e a patógenos (POQUET et al., 2016). Efeitos sinérgicos ocorrem quando a exposição simultânea a dois estressores resulta em um efeito maior do que a soma dos efeitos individuais. A mistura de agrotóxicos pode aumentar sinérgicamente a frequência de comportamentos anormais em polinizadores, assim como a letalidade sinérgica adversa (TOSI e NIEH, 2019). Especialmente fungicidas, que isolados não são considerados tóxicos para abelha, quando em combinação com outros compostos podem produzir efeitos negativos para esses insetos (WADE et al., 2019). Adicionalmente, além dos ingredientes ativos dos produtos, as abelhas são expostas igualmente aos adjuvantes usados em suas formulações que tem potencial para interagir com outros produtos e aumentar os efeitos tóxicos (ZHU et al., 2014; MULLIN et al., 2016; WERNECKE et al., 2022).

Considerando o potencial tóxico dos agrotóxicos, a utilização intensiva desses produtos nos cultivos agrícolas tem gerado preocupações quanto aos possíveis efeitos que podem causar em organismos não alvos (GUILLÉN et al., 2012). De acordo com Manual de Orientação para Avaliar os Risco de Agrotóxicos Sobre Abelhas (USEPA, PMRA et al., 2014), quando abelhas são utilizadas para a polinização dirigida, o potencial e a magnitude da exposição podem ser aumentados, sendo potencializados quando as aplicações de agrotóxicos são realizadas antes da floração nas culturas atrativas aos polinizadores.

Mesmo as exposições a baixas doses de agrotóxicos geram efeitos subletais em abelhas, podendo afetar seu comportamento e sistema imunológico (DESNEUX et al., 2007). Embora as doses subletais não causem morte desses indivíduos podem comprometer a manutenção e consequente sobrevivência da colmeia (JUMARIE et al., 2017; FAITA et al., 2018). Com isso, conhecer os efeitos subletais de agrotóxicos sobre estes organismos torna-se imprescindível (PRADO et al., 2019).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO BIOENSAIO E PADRONIZAÇÃO DE COLMEIAS

O bioensaio foi realizado no apiário experimental do Parque Cidade das Abelhas em Florianópolis (27 ° 32'38,4 "S 48 ° 29'59,5" W), pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A área experimental é circundada por uma unidade de conservação ambiental (4,92 Km²) onde no entorno não é permitido a prática agrícola e uso de agrotóxicos em um raio de 10 km. Para os experimentos, foram utilizadas 12 colmeias com caixas do tipo Langstroth com dez quadros cada.

A fim de obter uniformidade genética e populacional das colmeias e assim reduzir o erro experimental, as colônias foram adquiridas do mesmo fornecedor (apicultor), manejadas e monitoradas durante oito meses antes do início do bioensaio (julho de 2020 a março de 2021). Rainhas irmãs foram produzidas em todas as colmeias, para a realização das análises propostas, exceto para a produção de geleia real, pois devido aos experimentos realizados anteriormente, colmeias morreram e tiveram que ser repostas.

5.2 FUNGICIDAS UTILIZADOS NO BIOENSAIO

A escolha dos fungicidas utilizados foi baseada na grade de agrotóxicos com uso permitido para a produção integrada da maçã em Santa Catarina, ciclo 2020/2021 (Comissão Técnica Regional). Geralmente estes fungicidas são aplicados no pomar na época de floração das macieiras, momento que as abelhas estão presentes para realizar a polinização das flores (sistema de polinização dirigida). Ainda, de acordo com a bula dos produtos, eles são utilizados em diversos cultivos, como a soja, batata e tomate, para controlar fungos fitopatogênicos. Optou-se pelo uso dos produtos comerciais e não dos ingredientes ativos para reproduzir de forma acurada a real situação de campo.

A partir disso, e levando em consideração a toxicidade e modo de ação dos produtos, foram selecionados os seguintes fungicidas: Zignal[®] (modo de ação não classificado e extremamente tóxico, do grupo químico Fenilpiridinilamina) e Captan SC[®] (modo de ação de contato e pouco tóxico, do grupo químico Ftalimida). Sendo Fluazinam e Captana os respectivos ingredientes ativos, conforme a bula dos produtos referidos.

5.3 EXPOSIÇÃO DAS COLMEIAS AOS FUNGICIDAS

Foram utilizados quatro tratamentos: 1- Controle (sem exposição aos fungicidas – Ctrl); 2- Fungicida Zignal[®] (Zig); 3- Fungicida Captan SC[®] (Cap); e 4- Mistura de Zignal[®] e Captan SC[®] (Mix), conforme usualmente aplicada a campo; com três repetições (colmeias) de cada tratamento, totalizando 12 colmeias para o experimento, estruturado como Delineamento Completamente Casualizado. Cada tratamento foi composto por três colmeias, cada uma delas contendo, nove, sete e cinco quadros com abelhas.

A exposição das colmeias aos fungicidas foi por via oral, através do fornecimento de uma solução composta pela mistura de 100 g de pólen, coletados através de coletores de alvado instalados nas caixas; 200 mL de xarope de açúcar; 0,3 mL de Zignal[®] e 0,75 mL de Captan SC[®], para esses tratamentos isolados. No tratamento Mix, foi adicionado à solução, a mistura das dosagens utilizadas para os tratamentos Zig e Cap. Para o grupo controle, foi fornecido apenas xarope de açúcar com pólen.

A solução de cada tratamento foi administrada em alimentadores internos de superfície e fornecida semanalmente durante um mês (março de 2021), totalizando ao final do bioensaio uma dosagem de 1,2 mL de Zignal[®] e 3 mL de Captan SC[®] por colmeia dos tratamentos isolados e 4,2 mL da mistura dos dois. A dosagem dos fungicidas ministrada às colmeias foi estabelecida conforme a recomendação de aplicação do fabricante para a cultura da maçã. Para cada aplicação, a dosagem de ingrediente ativo correspondente aos fungicidas foi a seguinte: 0,15 g de Fluazinam / mL do Zignal[®] e 0,36 g de Captana / mL do Captan[®].

5.4 ANÁLISE DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEAS

As abelhas foram expostas por um mês as doses de campo dos fungicidas (março de 2021). Para a análise das glândulas hipofaringeas, um mês após a exposição aos fungicidas (abril de 2021), quadros com abelhas para emergir foram colocados em incubadora climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) e 60 abelhas recém emergidas de cada colmeia

foram marcadas no tórax com canetas coloridas atóxicas (Posca Paint Pens[®], Mitsubishi Pencil, Japan) e devolvidas às colmeias de origem. No sétimo e no décimo quinto dia após a reintrodução das operárias na colmeia, correspondendo a diferentes estádios de desenvolvimento das glândulas, 10 abelhas foram recoletadas, sendo cinco de cada idade, fixadas por 48 h em solução fixadora Karnowisky (glutaraldeído 5%, tamponado em cacodilato de sódio 0,1 M). Considerando três repetições (que totalizam 15 abelhas de cada idade por tratamento).

A metodologia aplicada para a análise das glândulas hipofaringenas é baseada no estudo realizado por Fanta et al. (2018). Resumidamente, para a análise da ultraestrutura, as abelhas foram dissecadas para extração das glândulas hipofaríngeas, que foram mantidas em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M até a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, para posterior infiltração em resina SPURR. As amostras já infiltradas e incluídas em resina, foram mantidas em estufa a 70°C, por 24 h, para completa polimerização da resina, posteriormente os blocos das amostras foram processados para ultramicrotomia, feitos os cortes ultrafinos (60 a 70 nm), que foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, e depois observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011), a uma tensão de aceleração dos elétrons de 80 kV. As imagens obtidas foram processadas com o software Gatan Digital Micrograph e depois interpretadas. A análise das imagens foi feita por comparação entre as estruturas dos diferentes tratamentos e com o que foi encontrado na literatura. O processamento das amostras e análises em microscopia foram realizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL

Visando otimizar as condições experimentais e reduzir os efeitos ambientais, a produção de geleia real foi realizada em dezembro de 2021, durante a primavera, quando as espécies da flora nativa adjacente ao apiário florescem. Para isso, três colmeias por tratamento, foram expostas aos tratamentos, durante um mês (novembro de 2021).

A geleia real foi obtida seguindo o método descrito por Chaves et al. (2020) para produção artificial de rainhas, com adaptações. Para estimular a produção da geleia real artificialmente é preciso que as colmeias estejam sem rainha. Portanto, as colmeias foram orfanadas. Em seguida, larvas de até 48 h de vida foram obtidas de quadros de criação e transferidas com o auxílio de uma agulha de enxertia de larvas, para células de acrílico contendo

1 μ L de geleia real. Os quadros contendo 40 células de acrílico com as larvas foram introduzidos nas colmeias de cada tratamento 24 h após a remoção das suas rainhas. A cada 72 h, os quadros com as larvas introduzidos na colmeia, foram removidos para contar o número de larvas aceitas pelas operárias (célula contendo larva e geleia real). As larvas alimentadas foram descartadas, a geleia real depositada nas células foi coletada e realizada uma nova transferência de larvas e reintrodução dos quadros nas colmeias.

No final de cada ciclo descrito acima, a geleia real foi coletada com uma espátula metálica, transferida para microtubos de polipropileno de 1,5 mL, pesados e armazenados sob refrigeração (-20°C). Foram efetuados três ciclos de produção de geleia real (replicatas) por colmeia, com três repetições (colmeias) por tratamento.

Para obter o peso total da geleia real por tratamento, os microtubos vazios foram previamente pesados em balança de precisão (BEL Engineering - MARK M503) e identificados. Quando preenchidos com o material coletado, foram novamente pesados e o peso de geleia real foi obtida pela diferença entre o peso do microtubo vazio e o cheio, posteriormente foi efetuado a soma de todos os valores. O peso médio de geleia real depositada por cúpula, para cada tratamento, foi obtido através da divisão do peso total da geleia real produzida, pelo número de cúpulas aceitas. O número de cúpulas aceitas por tratamento, corresponde quantas cúpulas continham larvas e geleia real.

5.6 AVALIAÇÃO DA FORÇA DAS COLMEIAS

A avaliação da força das colmeias foi efetuada em todas as colmeias que compõem o bioensaio, com três repetições por tratamento, e ocorreu em quatro momentos. A primeira avaliação foi antes da exposição das colmeias aos agrotóxicos (início de março de 2021); a segunda, 45 dias depois de exposição (final de abril de 2021); a terceira, 135 dias após a exposição (final de julho de 2021); e a quarta, 180 dias após a exposição (final de outubro de 2021). As avaliações foram realizadas de acordo com o método subjetivo proposto por Delaplane et al. (2013), em que foram avaliados, número de quadros contendo ninhada aberta e fechada, aqueles contendo abelhas em ambos os lados e os que contêm alimento armazenado.

A área do quadro coberto de abelhas, ninhada aberta e fechada, mel e pólen de cada colmeia foi visualmente estimada por dois observadores humanos previamente treinados, cada um auxiliado por outra pessoa que anotou as observações. As avaliações foram realizadas no início da manhã. Os observadores descreveram a massa de abelhas no quadro e estimaram a porcentagem que elas cobriam. O mesmo procedimento foi adotado para a área de cria e

alimento. Os valores das porcentagens de cada parâmetro foram registrados e posteriormente somados para obter o número de quadros que continham ninhada aberta, ninhada fechada, com armazenamento de alimentos e com abelhas cobrindo sua superfície em ambos os lados.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos da produção de geleia real foram submetidos ao teste de normalidade Ryan-Joiner (similar ao Shapiro-Wilk) e posteriormente foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos para análise de variância de três fatores: tratamentos, ciclos e colmeias (ANAVA). As colmeias foram consideradas como de efeitos aleatórios para refletir a estrutura de agrupamento nos dados. Os ciclos foram aninhados em colmeias para diluir o efeito das subamostras (replicatas). As análises foram realizadas no programa Minitab[®] 21.1.

Para cada um dos quatro componentes da força das colmeias (número de quadros: com abelhas adultas, cria aberta, cria fechada e com alimento) foram estimadas a média e erro padrão, posteriormente foi confeccionado um histograma no Excel. Para testar a associação ou a independência entre a exposição e a não exposição aos fungicidas com cada um dos quatro componentes da força das colmeias foram utilizadas tabelas de contingências e estimado a significância estatística dos valores dos desvios do teste de qui-quadrado (χ^2).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ULTRAESTRUTURAS DAS GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS

A análise das fotomicrografias das glândulas hipofaringeanas das abelhas de diferentes idades (sete e 15 dias), indicou diferenças nas organelas celulares em abelhas pertencentes as colmeias que receberam alimento contendo Captan[®] e Zignal[®], isolados e em combinação, quando comparadas o grupo controle. As principais alterações foram identificadas nas mitocôndrias (M) e no retículo endoplasmático rugoso (Rer). Não foram percebidas alterações nas estruturas do núcleo (N) em nenhum tratamento (Figura 1 e 2).

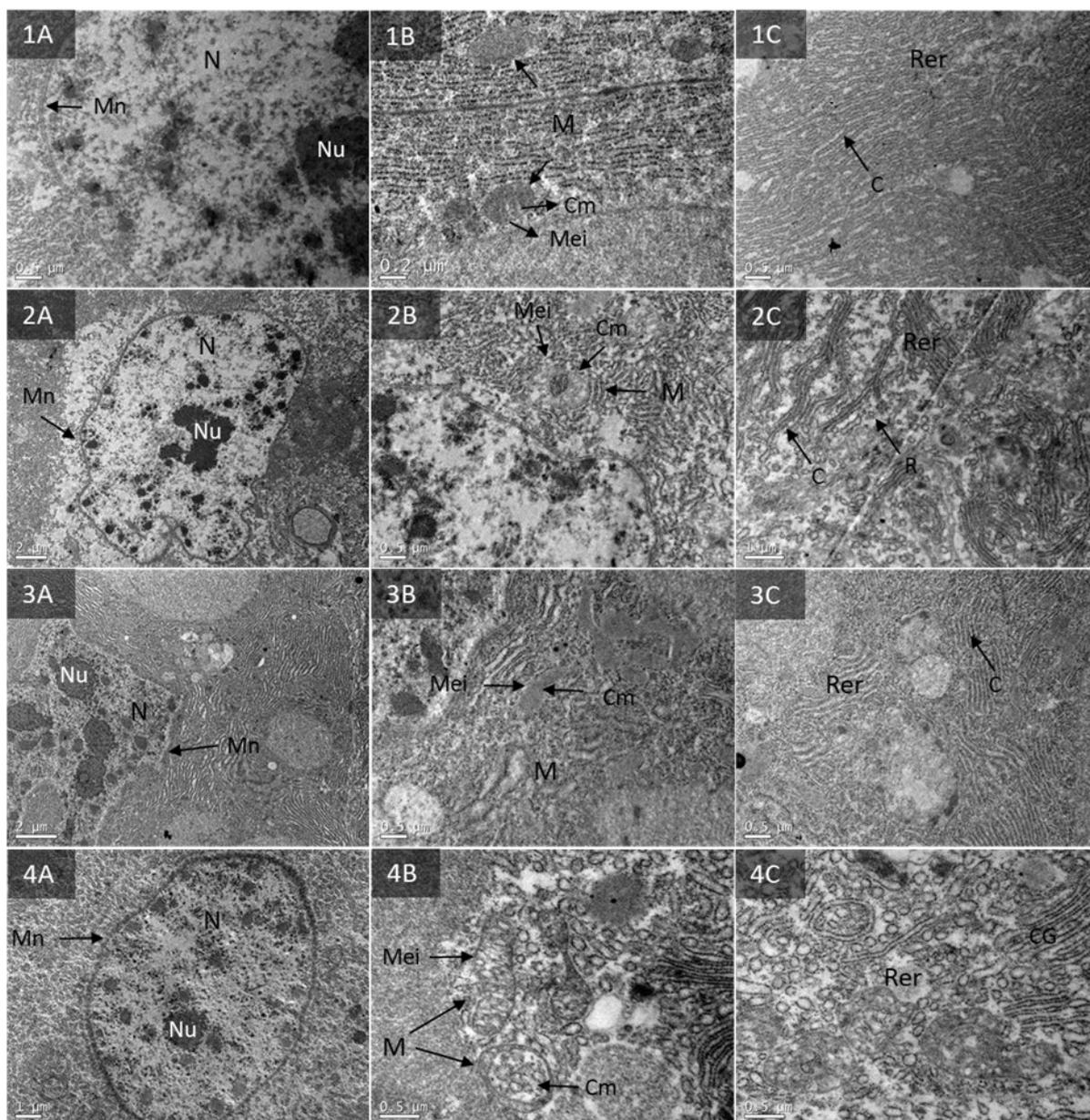


Figura 1. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* com **sete dias após a emergência**, expostas à alimentação com diferentes tratamentos, sendo: 1A - 1C - controle; 2A - 2C - Captan®; 3A - 3C - Zignal®; e 4A - 4C - Mix (Captan®+Zignal®). Mitocôndrias de abelhas alimentadas com Captan®, apresentando formato de rosca (anelar), membranas externas e internas não preservadas e interior com cristas mitocondriais vacuolizadas (2B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas espaçadas e descontínuas, com citoplasma de aspecto heterogêneo e fragmentado (2C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Mix, demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólucido (4B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas com espaçamento anormal e citoplasma heterogêneo (4C). Estas alterações das mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso não foram observadas nas abelhas do grupo controle e Zignal® e nos núcleos de todos os tratamentos. Legenda: Núcleo (N); Nucléolos (Nu); Membrana nuclear (Mn); Mitocôndria (M); Cristas mitocondriais (Cm); Membrana externa e interna (Mei); Retículo endoplasmático rugoso (Rer); Cisterna (C); Ribossomos (R); e Complexo de golgi (CG).

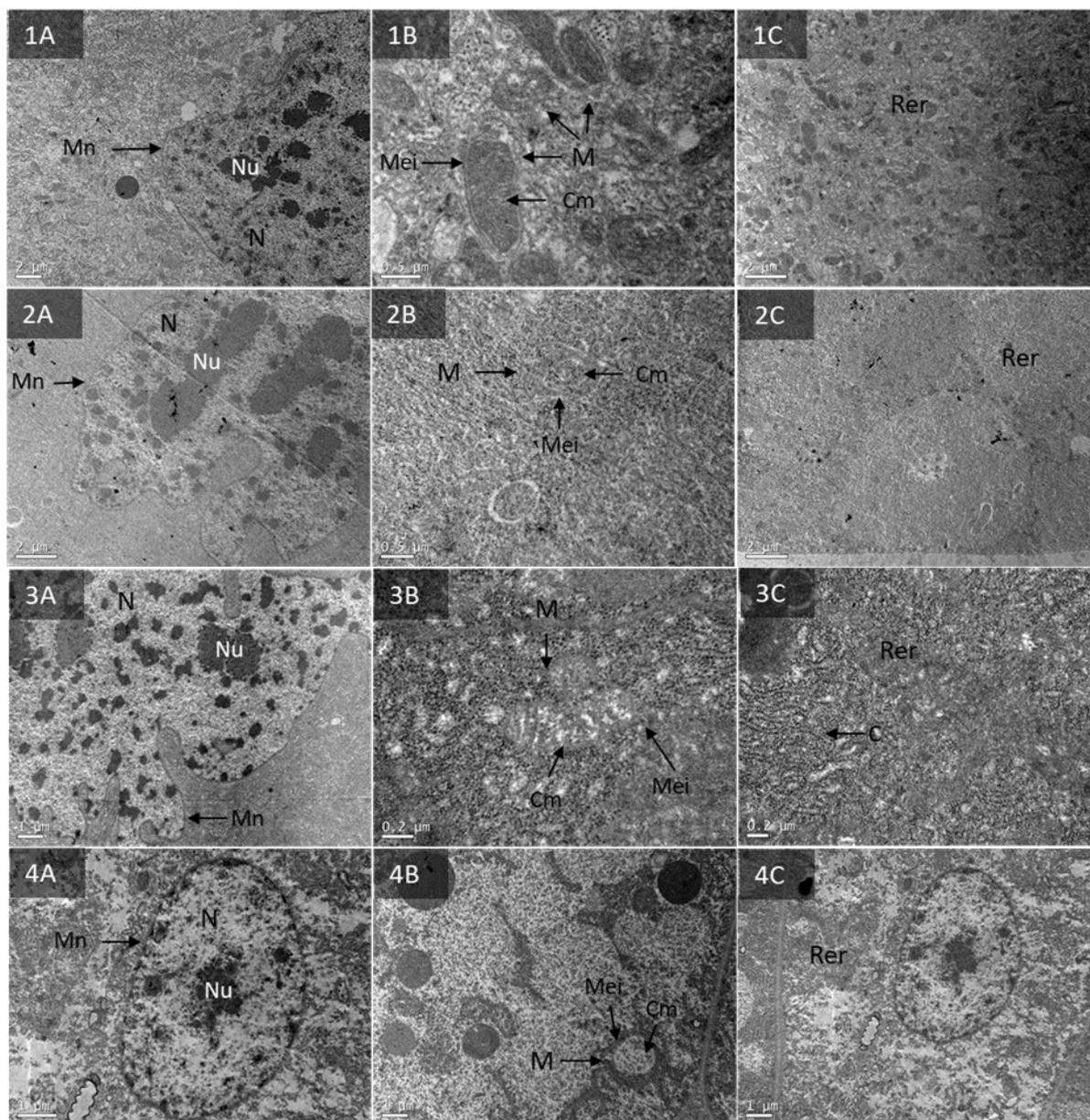


Figura 2. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* com **15 dias após a emergência**, expostas à alimentação com diferentes tratamentos, sendo: 1A - 1C - controle; 2A - 2C - Captan®; 3A - 3C - Zignal®; e 4A - 4C - Mix (Captan®+Zignal®). Mitocôndrias de abelhas alimentadas com Captan®, apresentando formato de rosca, membranas externas e internas não preservadas e interior vacuolizado (2B); retículo endoplasmático rugoso com ausência de cisternas normais e citoplasma eletrondenso (2C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Zignal®, demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólúcido (3B); retículo endoplasmático rugoso com cisternas espaçadas e citoplasma com aspecto heterogêneo e eletrondenso (3C). Mitocôndrias de abelhas expostas ao Mix, demonstrando interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólúcido (4B); retículo endoplasmático rugoso com ausência de cisternas normais e citoplasma eletrondenso (4C). Estas alterações das mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso não foram observadas nas abelhas do grupo controle e nos núcleos de todos os tratamentos. Legenda: Núcleo (N); Nucléolos (Nu); Membrana nuclear (Mn); Mitocôndria (M); Cristas mitocondriais (Cm); Membrana externa e interna (Mei); Retículo endoplasmático rugoso (Rer); Cisterna (C); Ribossomos (R); e Complexo de golgi (CG).

Nas abelhas que ingeriram alimento contendo Captan[®], foi possível verificar alterações morfológicas nas mitocôndrias, que apresentaram formato de rosca (anelar), com membranas externas e internas (Mei) não preservadas e interior com cristas mitocondriais (Cm) vacuolizadas, tanto nas abelhas de sete, quanto de 15 dias de idade (Figura 1 e 2 - 2B). No tratamento Mix, as mitocôndrias de abelhas com sete e 15 dias, revelaram interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólucido (Figura 1 - 4B; Figura 2 - 4B). Esse padrão também foi observado para as abelhas de 15 dias do grupo Zignal[®] (Figura 2 - 3B).

O retículo endoplasmático rugoso (Rer), das abelhas com sete e 15 dias de idade expostas ao Captan[®] e Mix, apresentaram cisternas (C) espaçadas e descontínuas (Figura 1 - 2C e 4C). O Rer de abelhas com 15 dias pertencentes aos tratamentos Captan[®], Zignal[®] e Mix revelou cisternas anormais (Figura 2 - 2C, 3C e 4C).

Abelhas com sete e 15 dias de idade expostas ao Captan[®] e Mix, demonstraram citoplasma de aspecto heterogêneo (Figura 1 - 2C e 4C). Abelhas de sete dias do grupo Captan[®], demonstraram citoplasma contendo organelas fragmentadas (Figura 1 - 2C). Abelhas com 15 dias pertencentes aos tratamentos Captan[®], Zignal[®] e Mix revelou citoplasma eletrondenso (Figura 2 - 2C, 3C e 4C). Citoplasma heterogêneo também foi observado nas micrografias de abelhas com 15 dias do grupo Zignal[®] (Figura 2 - 3C).

As mitocôndrias são apontadas como confiáveis biossensores na avaliação do potencial da toxicidade de compostos químicos (PEREIRA et al., 2012). De acordo com Ding et al. (2012), em resposta ao dano oxidativo mitocondrial, as mitocôndrias passam por alterações estruturais para manter a homeostase, apresentando forma de anel ou em de “C”. No presente estudo, formato anelar foi observado nas mitocôndrias de abelhas com sete e 15 dias que ingeriam Captan[®] (Figura 1 e 2 - 2B), sugerindo que este fungicida pode causar danos oxidativos nessas organelas. Membranas externas e internas não preservadas e interior vacuolizado também foram visualizadas para este tratamento nas duas idades avaliadas.

O Captan[®] é descrito como um fungicida multissítios, indicando que o ingrediente ativo ou o produto comercial afeta diversas estruturas fúngicas (YANG et al., 2011). A reação do Captan[®] com o tiol (composto organossulfurado – álcool) presente também em fungos, é apontado como seu principal mecanismo de ação, responsável pela redução da atividade enzimática geral, respiração e muitas outras alterações morfológicas nesses organismos (LUKENS, 2013). Scariot et al. (2017) descrevem que o Captan[®] causa aumento de espécies reativas de oxigênio, oxidando os grupos tióis presentes nas células fúngicas, e que a maioria das células do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que foram submetidas a esse fungicida

perderam sua integridade de membrana, morrendo por necrose, devido à essa reação do fungicida com os tióis fúngicos.

Mitocôndrias de abelhas com sete e 15 dias expostas aos dois fungicidas combinados (Mix) revelaram interior vacuolizado e cristas mitocondriais anormais, com aspecto eletrólucido (Figura 1 - 4B; Figura 2 - 4B), essas alterações também foram observadas para as abelhas de 15 dias do grupo Zignal[®] (Figura 2 - 3B). Nossos resultados estão de acordo com Chen et al. (2018), que observou danos causados pelo fluazinam (i.a. do Zignal[®]) à parede e a membrana celular do micélio do fungo *Bipolaris maydis*, fazendo com que as organelas na célula micelial fossem dissolvidas e vacuolizadas.

Há fortes evidências de que o modo de ação do fluazinam é na inibição do processo de produção de energia da célula fúngica, através da inibição direta da síntese de ATP (trifosfato de adenosina), sendo que o principal local de ataque é na mitocôndria (JOHNSON e ATALLAH, 2006; VITORATOS, 2014). O fluazinam atua na respiração dos fungos, sendo um desacoplador de fosforilação oxidativa (GUO et al., 1991; BRANDT et al., 1992; OSTIGUY, 2019). Complementarmente, após o tratamento com fluazinam, a respiração micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi inibida (HOU et al., 2019).

Adicionalmente, no presente estudo, nas abelhas que receberam alimento contendo os fungicidas Captan[®], Zignal[®] e o Mix, com sete dias de idade, o Rer se apresentou fragmentado e descontínuo, com espaços entre as cisternas, assemelhando-se as células de glândulas hipofaringeanas de operárias forrageiras e não mais de nutrízes, que estariam produzindo geleia real. Este resultado configura a regressão precoce dessas estruturas, semelhante ao observado por Fanta et al. (2018), quando abelhas foram expostas ao herbicida Roundup[®]. A degeneração do Rer também foi anteriormente percebida por Deseyn e Billen (2005) e Elaidy (2014), em abelhas forrageiras com 27 dias de idade. Não obstante, em condições normais, células secretoras ativas apresentam Rer bem desenvolvido e organizado, com intensa atividade de síntese proteica (COSTA e CRUZ-LANDIM, 1992), o que está em desacordo com o observado no presente trabalho.

Complementarmente, o Rer é uma organela responsável pela síntese e transporte proteico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000) e o Captan[®] é um fungicida que penetra nos fungos provocando reações químicas não específicas com grupamentos sulfidrílicos (SH), aminos (NH₂) e hidroxílicos (OH) presentes nas proteínas (GARCIA, 1999). Neste sentido, Zaluski et al. (2020) relataram que os inseticidas piraclostrobina (i.a) e o Fipronil[®] foram capazes de reduzir a expressão de proteínas presentes na geleia real. Menor quantidade de vesículas secretoras de geleia real, que indicam menor síntese proteica, foram constatadas por

Faita et al. (2018) nas glândulas hipofaringeanas de abelhas expostas ao Roundup®. No entanto, estes efeitos não foram avaliados no presente trabalho.

A partir destas observações, podemos inferir que a exposição das abelhas ao alimento contendo os fungicidas testados, promoveu alterações ultraestruturais das glândulas hipofaringeanas, correspondendo ao envelhecimento precoce e degeneração das organelas destas estruturas, em abelhas após sete dias de idade. A degeneração prematura de células como do retículo endoplasmático rugoso pode fazer com que as abelhas operárias antecipem a tarefa de forrageamento, diminuindo o número de nutrizas que desempenham cuidados com a ninhada (FAITA et al., 2018). As consequências seriam a redução da ninhada, o menor tempo de vida para as operárias adultas, com consequente prejuízos ao desenvolvimento da colmeia (HATJINA et al., 2013).

É necessário destacar ainda do presente estudo, que o citoplasma das células de abelhas que ingeriram alimento contendo Captan®, Zignal® e Mix revelou-se heterogêneo e eletrondenso, semelhante com o descrito por Silva-Zacarin et al. (2008) para morte celular de glândulas salivares em larvas de *A. mellifera*. Scariot et al. (2017), mostraram que a maioria das células de *S. cerevisiae* que foram expostas ao Captan® morreram por necrose devido à reação do fungicida com os tióis. Estas células apresentaram comportamento apoptótico que pode ser o resultado da depleção de tiol não proteico e consequente aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Eventos de morte celular por necrose e apoptose também foram observados em abelhas expostas a outros agrotóxicos, pois Smodis-Skerl e Gregorc (2010) relataram a ocorrência de células apoptóticas e necróticas em glândulas hipofaringeanas por efeito de inseticidas.

Não foram encontradas alterações no núcleo celular das glândulas analisadas, independentemente do tratamento. Isso pode ser explicado pelo tempo de exposição ao qual as abelhas foram submetidas aos fungicidas. Assim como é possível que os fungicidas testados não sejam capazes de alterar esta estrutura celular. Isso precisa ser melhor investigado.

Estudos que avaliam os efeitos adversos de agrotóxicos sobre as glândulas hipofaringeanas de abelhas são escassos. Contudo, foram observadas alterações ultraestruturais nas células das glândulas de *A. mellifera* que ingeriram alimento contendo resíduos do herbicida Roundup® (i.a. glifosato). Essas alterações incluem danos às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático rugoso (FAITA et al., 2018), conforme observado neste trabalho. Segundo Berenbaum e Liao (2019), o tamanho, a morfologia e a atividade da glândula hipofaríngea são afetados por diversos agrotóxicos, incluindo fungicidas. Em conformidade, o fungicida piraclostrobina afeta negativamente as funções mitocondriais de abelhas melíferas,

demonstrando inibição da fosforilação oxidativa e respiração celular. Além disso, a exposição a fungicida a base de piraclostrobina promoveu declínio no potencial da membrana mitocondrial e na síntese de ATP em abelhas (NICODEMO, 2020). A exposição de abelhas nutrizas a doses de campo de piraclostrobina e ao inseticida Fipronil®, ainda causaram alterações morfológicas nas células do epitélio da glândula mandibular e glândulas hipofaríngeas desses insetos (ZALUSKI et al., 2017).

Além das alterações ultraestruturais, foram observadas também mudanças no aspecto morfológico das glândulas de abelhas de 15 dias de idade expostas ao tratamento mix, quando comparadas ao tratamento controle (Figura 3).

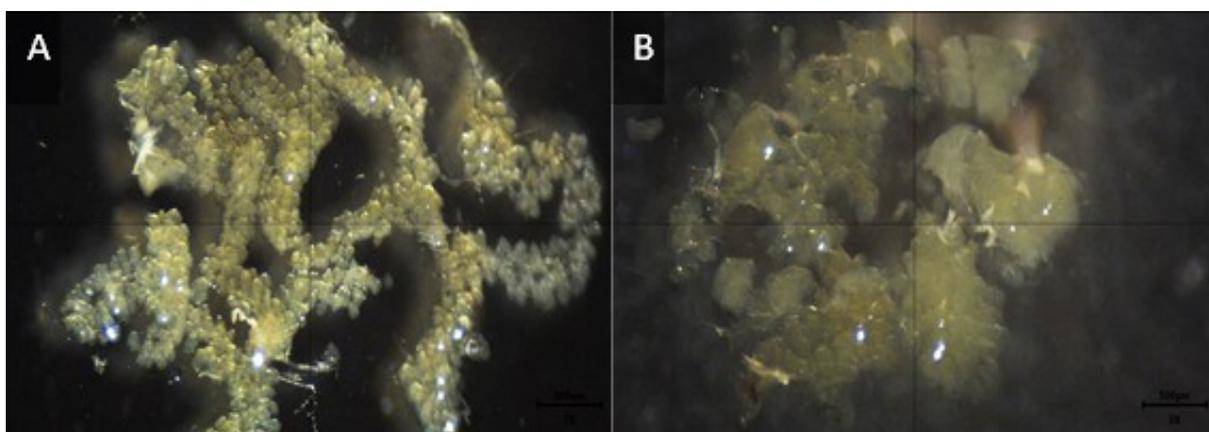


Figura 3. Glândulas hipofaríngeas de abelhas com 15 dias após a emergência. A: glândula de abelha operária pertencente ao grupo controle. B: glândula de abelha operária pertencente ao grupo Mix, apresentando ácidos deformados com aspecto gelatinoso e túrbido. Imagens registradas em Lupa Opticam. Fonte: CHAVES, 2021.

Nas imagens obtidas em estereomicroscópio, podemos observar que as glândulas de abelhas expostas aos fungicidas combinados (Figura 3-B) demonstram aspecto gelatinoso e túrbido, com ácidos deformados, em comparação as abelhas do grupo controle (Figura 3-A), indicando que os fungicidas também podem alterar a morfologia dos ácidos e conseqüentemente o aspecto das glândulas. Faíta et al. (2018), relatam que quando abelhas foram expostas ao herbicida Roundup®, as glândulas hipofaríngeas apresentaram aspecto esponjoso, com ácidos extremamente túrgidos, semelhante ao que observamos no presente estudo. No entanto, análises morfológicas dos ácidos não foram objetivo deste trabalho, sendo assim, avaliações apuradas terão que ser realizadas para melhores conclusões.

Adicionalmente, inseticidas neonicotinóides utilizados nos cultivos agrícolas, e acaricidas utilizados nas colmeias, causam morte celular das glândulas de abelhas, reduzindo o tamanho dos ácidos glandulares (ALAUX et al., 2010; SKERL e GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013).

6.2 PRODUÇÃO DE GELEIA REAL

Os resultados obtidos no presente estudo relacionados a produção de geleia real não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios dos três ciclos de produção, de peso total e por cúpula da geleia real e número de larvas aceitas em colmeias expostas aos tratamentos: controle, Zignal[®], Captan[®] e Mix.

Tratamento	Parâmetros quantitativos		
	Peso total (g) *	Peso p/ cúpula (g) *	Nº de larvas aceitas*
Controle	6,2	0,2	25
Zignal [®]	4,5	0,2	23
Captan [®]	3,9	0,2	19
Zignal [®] + Captan [®]	6,4	0,2	28

* Segundo a ANAVA, as médias não diferem entre si a um nível de significância de 5%. Número de amostras por tratamento igual a nove.

Levando em consideração as alterações observadas nas glândulas hipofaringenas das abelhas expostas aos fungicidas do presente trabalho, seria compreensível que houvesse alterações quanto a produção de geleia real. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, para as três características avaliadas. Contudo, pode-se observar que para peso total e número de larvas aceitas ou alimentadas, o grupo que recebeu o Mix de fungicidas (Zignal[®] e Captan[®]), foi o que apresentou os maiores valores. Esse resultado pode levantar a hipótese, de que tenha ocorrido neste caso, um fenômeno já constatado em insetos de importância agrícola de diferentes táxons, conhecido como hormese (CALABRESE, 1999; FORBES, 2000).

A hormese é caracterizada pela melhora (ex.: maior fecundidade) de um organismo quando é exposto a doses subletais de agentes estressantes, como os compostos químicos (CALABRESE e BALDWIN, 1998; CALABRESE, 1999; FORBES, 2000). Para abelhas e, especificamente, em características analisadas na geleia real e uso de fungicidas, nada foi documentado até o presente momento. Porém, há relatos de ocorrência da hormese em insetos e ácaros, causada por exposição a doses subletais de inseticidas, com aumento da fecundidade e sobrevivência (MORSE, 1998). Como exemplos, o inseticida permetrina estimulou a viabilidade de ovos do percevejo predador *Podisus distinctus* (MAGALHÃES et al., 2002) e aumentou ganho de peso e sobrevivência de fêmeas do percevejo predador *Supputius cincticeps* (ZANUNCIO et al., 2003). O inseticida deltametrina, aumentou o consumo de grãos e prole do

gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (VÉLEZ et al., 2018). Contudo, a hipótese de que tenha ocorrido hormese com as abelhas utilizadas no presente estudo merece novos estudos com um maior número de repetições.

Em um estudo anterior, de Chaves et al. (2020) em que as abelhas foram expostas a doses subletais do herbicida Roundup[®], houve redução da geleia real produzida por *A. mellifera*, resultados diferentes do presente trabalho, que avaliou o efeito de fungicidas sobre a produção de geleia real. No presente estudo, ocorreram fatos que podem justificar a não diferenciação significativa observada entre os tratamentos em termos de produção de geleia real. A produção de geleia real foi a última análise a ser realizada, pois deve acontecer na primavera e as colmeias precisam ser orfanadas, não possibilitando a realização de outras análises por um longo período. Portanto, devido as exposições anteriores, algumas colmeias morreram e tiveram que ser repostas. Como não havia tempo hábil para produzir rainhas irmãs para essas colônias, como feito para as outras análises, não foi possível garantir a homogeneidade genética das rainhas em busca de reduzir o erro experimental.

Outro ponto que deve ser levado em consideração, que pode justificar a falta de diferenças significativas, é o número de amostras obtidas. Antes de iniciar os experimentos como previsto no projeto, tínhamos cinco colmeias para cada tratamento, mas devido a condições climáticas não favoráveis, entre outros fatores, várias colmeias não sobreviveram até o início dos bioensaios. Com isso, foram utilizadas três colmeias por tratamento. Complementarmente, em consequência de falta de tempo, foram realizados apenas três ciclos de produção de geleia real por colmeia. Isso posto, foi constatado que todas essas situações devem ser evitadas em futuros trabalhos.

Ainda assim, não podemos descartar a possibilidade de que os fungicidas não sejam capazes de alterar a quantidade de geleia real produzida. Com isso, há a necessidade de se repetir o experimento, corrigindo as falhas observadas, pois assim poderá ser testada as hipóteses aqui levantadas para esta análise. Não obstante, por mais que a hipótese aceita fosse que os fungicidas não alteram a produção de geleia real, outras alterações devem ser avaliadas na geleia real produzida, como qualidade nutricional e constituição proteica, entre outros. Tais análises que embora não eram objetivo desta pesquisa, se tornaram relevantes de serem feitas em razão dos resultados obtidos no presente trabalho.

6.3 FORÇA DAS COLMEIAS

Nas avaliações realizadas sobre a força das colmeias, de acordo com os erros padrões das médias (linhas sobre as barras horizontais), foi possível verificar que antes da exposição, todas as colmeias se apresentavam em homogeneidade para as variáveis analisadas (Figura 4).

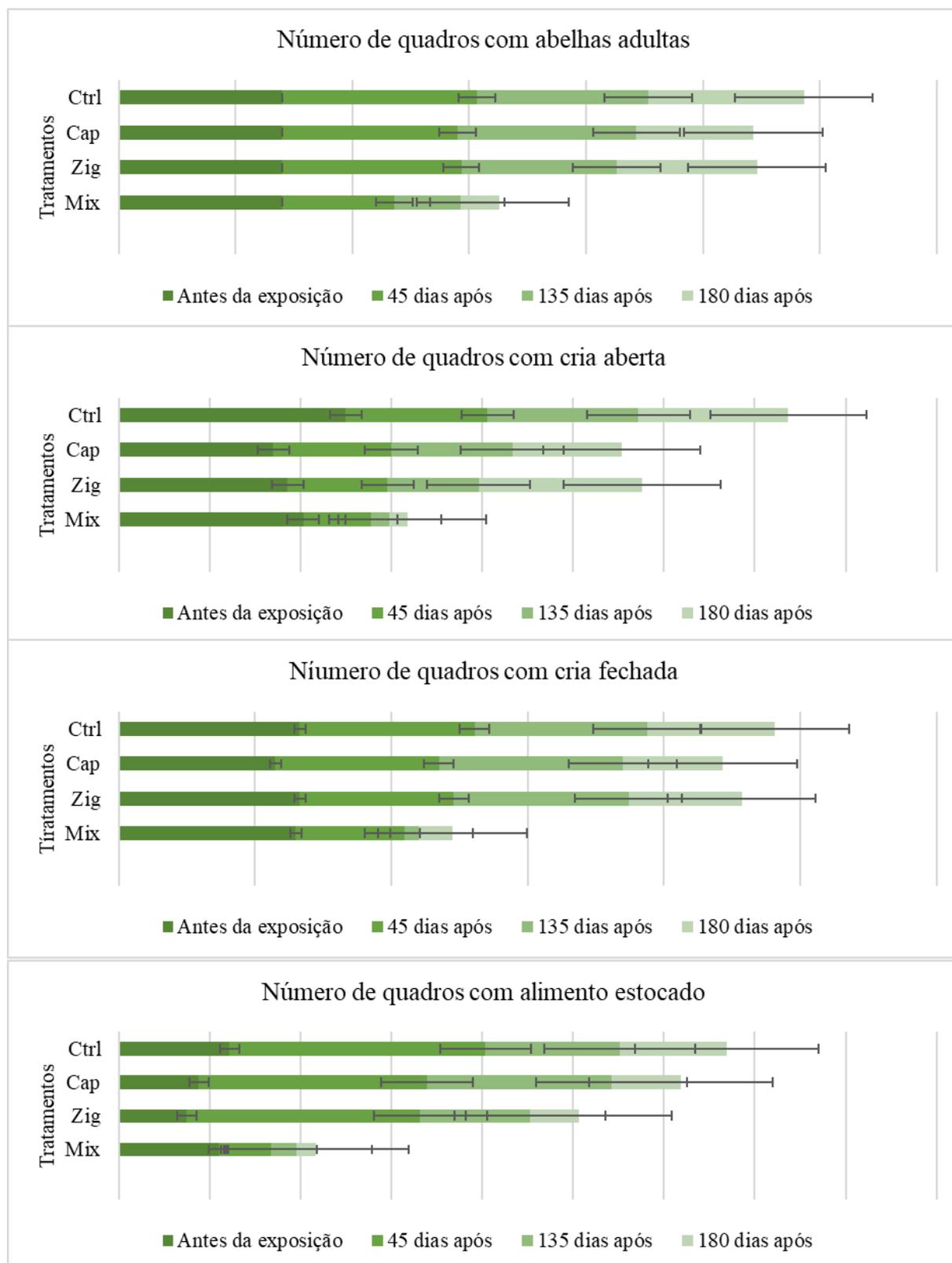


Figura 4. Erro padrão dos componentes da força das colmeias (número de quadros: com abelhas adultas, cria aberta, cria fechada e com alimento), expostas aos tratamentos (Ctrl = controle, Zig = Zignal[®], Cap = Captan[®] e Mix = Zig + Cap), em quatro momentos distintos (antes da exposição, 45, 135 e 180 dias após). Os histogramas foram produzidos no Excel 2019.

A exposição das abelhas aos fungicidas Zignal[®] e Captan[®] combinados (tratamento Mix), promoveu maior redução na densidade de população adulta, de crias abertas e fechadas e na quantidade de alimento estocado, em comparação aos demais tratamentos, nos três momentos avaliados após a exposição (45, 135 e 180 dias). Os tratamentos Zignal[®] e Captan[®] isolados, não se mostraram diferentes do grupo controle quanto a população de abelhas adultas, crias fechadas e quadro com alimento nos três tempos após a exposição. Porém, em termos de crias abertas, o tratamento controle mostrou valores maiores do que os outros, nos três momentos avaliados após a exposição (Figura 4).

O teste de qui-quadrado empregado para identificar se as características componentes da força da colmeia apresentaram comportamento aleatório ou não com a exposição aos fungicidas, reforçam esses resultados (Tabela 2), pois os valores de χ^2 se mostraram maiores e significativos quando as abelhas foram submetidas ao tratamento Mix em comparação com os demais tratamentos, para as quatro características analisadas.

Tabela 2. Valores de qui-quadrado (χ^2) e a respectiva probabilidade (P) de comparação entre os quatro componentes da força das colmeias avaliados (número de quadros com abelhas adultas; número de quadros com cria aberta; número de quadros com cria fechada e número de quadros com alimento), e os quatro tratamentos (Ctrl: Controle; Cap: Captan[®]; Zig: Zignal[®] e Mix: Zignal[®] + Captan[®]).

Comparações	χ^2	Graus de Liberdade	P
População de abelhas adultas			
Ctrl vs Cap	0,204	3	0,976
Ctrl vs Zig	0,024	3	0,999
Ctrl vs Mix	2,435	3	0,487
Cap vs Zig	0,161	3	0,983
Cap vs Mix	1,902	3	0,593
Zig vs Mix	2,006	3	0,571
Cria aberta			
Ctrl vs Cap	0,021	3	0,999
Ctrl vs Zig	0,148	3	0,985
Ctrl vs Mix	1,129	3	0,770
Cap vs Zig	0,182	3	0,980
Cap vs Mix	1,182	3	0,757
Zig vs Mix	1,246	3	0,741
Cria fechada			
Ctrl vs Cap	0,057	3	0,996
Ctrl vs Zig	0,019	3	0,999
Ctrl vs Mix	1,645	3	0,649
Cap vs Zig	0,042	3	0,997
Cap vs Mix	1,814	3	0,611
Zig vs Mix	1,621	3	0,654
Alimento estocado			
Ctrl vs Cap	0,451	3	0,929
Ctrl vs Zig	0,329	3	0,954
Ctrl vs Mix	1,780	3	0,619
Cap vs Zig	0,288	3	0,962
Cap vs Mix	2,446	3	0,485
Zig vs Mix	2,110	3	0,549

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível inferir que a exposição simultânea a dois fungicidas afeta negativamente a força das colmeias quando comparado com a ingestão dos produtos isolados, ou principalmente, quando não ocorre a ingestão desses químicos pelas abelhas. Também se torna notório, que a exposição combinada aos fungicidas, em doses de campo, prejudica as colmeias a longo prazo.

A relação entre a presença de fungicidas, com o baixo desenvolvimento de colmeias também foi demonstrada por Traynor et al. (2016; 2021) e Bernauer et al. (2015), em *A. mellifera* e *Bombus impatiens*, respectivamente. Adicionalmente, fungicidas foram associados a efeitos deletérios sobre rainhas de *A. mellifera*, comprometendo sua sobrevivência e sanidade (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2013).

Os efeitos reportados anteriormente, e também observados no presente estudo, assemelham-se aos achados de Sandrock et al. (2014) que avaliou os efeitos da exposição crônica de abelhas a dois inseticidas neonicotinóides (a base de tiametoxame e clotianidina). Estes autores verificaram redução no número de abelhas adultas, de ninhada, de produção de mel e de pólen armazenado (forrageamento) das colmeias. Redução do número de ninhada também foi observada no estudo de campo utilizando o inseticida imidacloprido (SMET et al., 2017). Além disso, Prado et al. (2019), verificaram que a misturas de agrotóxicos diminuiu o armazenamento de pólen e população de abelhas adultas. Estes resultados evidenciam a necessidade de desenvolver avaliações dos efeitos crônicos de agrotóxicos em colmeias, mesmo daqueles considerados seguros para abelhas, como fungicidas. Em geral, os testes de toxicidade são realizados em laboratório, mantendo grupos de abelhas em condições controladas, o que não reflete situações de campo e nem mesmo da colmeia. Além disso, os estudos são, em geral, de curta duração, chegando a 120h de avaliações.

A observação de queda no armazenamento de pólen e mel nas colônias expostas ao tratamento Mix do presente estudo, pode ser interpretada como uma resposta a redução do forrageamento. Já foi demonstrado que fungicidas impactam o metabolismo energético de abelhas, com consequente redução de forrageamento (PRADO et al., 2019; LIAO et al., 2019). Além disso, piraclostrobina promoveu declínio no potencial da membrana mitocondrial e na síntese de ATP, o que é crítico para a atividade de voo das abelhas no momento do forrageamento (NICODEMO, 2020). O fungicida Pristine[®] reduziu a capacidade de aprendizagem de *A. mellifera*, principalmente do forrageamento (DESJARDINS et al., 2021). Neste sentido, é possível que a exposição das abelhas aos fungicidas Captan[®] e Zignal[®], isolados e em mistura, tenha comprometido sua atividade de forrageio, resultando em menor quantidade de alimento estocado nas colmeias destes tratamentos.

A diminuição no número de abelhas forrageiras adultas, acarreta menor armazenamento de alimento e, conseqüentemente, menor número de ninhada. Perdas acentuadas de forrageiras desencadeiam recrutamento prematuro de operárias para a coleta de recursos, resultando em menos abelhas nutrizas disponíveis para criação de ninhadas (KHOURY et al., 2011; WU et al., 2011; HATJINA et al., 2013).

Complementarmente, segundo Berenbaum e Liao (2019), o tamanho, a morfologia e a atividade da glândula hipofaringeana são afetados por diversos agrotóxicos, incluindo fungicidas. Em conjunto, estas perturbações acabam alterando a frequência, duração e qualidade do comportamento de enfermagem desempenhado pelas abelhas nutrizas. Assim, as alterações morfológicas nas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso das glândulas de

abelhas que ingeriram fungicidas, observadas no presente estudo, também podem ter colaborado para a redução de ninhada observada. Sendo que a degeneração prematura de células como do retículo endoplasmático rugoso pode fazer com que as abelhas operárias antecipem a tarefa de forrageamento, diminuindo o número de operárias nutrizas que desempenham cuidados com a ninhada (FAITA et al., 2018). Conseqüentemente ocorre a redução da ninhada, menor tempo de vida para as operárias adultas, gerando prejuízos ao desenvolvimento da colmeia (HATJINA et al., 2013).

Além disso, as abelhas operárias podem regular a taxa de postura de uma rainha controlando a quantidade e a qualidade do alimento fornecido a ela (WINSTON, 1987). A postura de uma rainha pode ser inibida por consequência da sua desnutrição, reduzindo o desenvolvimento e a sobrevivência de uma colônia (SCHOTT et al., 2021).

Geralmente se assume que fungicidas não afetam abelhas, pois do ponto de vista agrônomo, não são seu alvo de ação, principalmente devido aos seus altos valores e DL50. No entanto, Pettis et al. (2013) relatam que a exposição das abelhas aos fungicidas pode torná-las mais suscetíveis a patógenos como o parasita intestinal *Nosema ceranae*. Fungicidas também foram relacionados com o aparecimento de distúrbios das colônias (SIMON-DELISO et al., 2014); alterações comportamentais adversas (TADEI et al., 2019), como agitação e mudanças na coordenação motora (LEITE et al., 2018). Não obstante, a piraclostrobina interfere na capacidade de desintoxicação das abelhas (BERENBAUM e JOHNSON, 2015), pois causa alterações nas expressões gênicas de enzimas de desintoxicação (TOMÉ et al., 2020). Importante levar em consideração que os fungicidas interferindo no sistema de desintoxicação das abelhas podem potencializar os efeitos de outros agrotóxicos (JOHNSON et al., 2013; POQUET et al., 2016) e prejudicar as colônias.

É relevante ressaltar que o presente estudo focou no efeito de doses de campo ou consideradas subletais, portanto, em efeitos crônicos. Assim, no final das avaliações, após 180 dias (6 meses após a exposição aos fungicidas), duas, das três colmeias pertencentes ao tratamento mix haviam morrido. Misturas de resíduos de agrotóxicos podem resultar em toxicidade sinérgica para as abelhas (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014). A exposição simultânea a produtos químicos, mesmo em doses baixas, pode tornar-se letal quando, por exemplo, as abelhas são expostas a essa mistura e a patógenos (POQUET et al., 2016). Efeitos sinérgicos ocorrem quando a exposição simultânea a dois estressores resulta em um efeito maior do que a soma dos efeitos individuais. A mistura de agrotóxicos pode aumentar sinérgicamente a frequência de comportamentos anormais em polinizadores, assim como a letalidade sinérgica adversa (TOSI e NIEH, 2019).

A ingestão de fungicidas também causa toxicidade direta para as abelhas adultas de *A. mellifera* (ZHU et al., 2014) e para abelhas solitárias, sendo que o fungicida Captan® limitou drasticamente a sobrevivência da abelha azul *Osmia lignaria* (LADURNER et al., 2005). Adicionalmente, Leite et al. (2018) relataram baixa sobrevivência em abelhas *A. mellifera* expostas por via de contato ao difenoconazol (i.a.). A sobrevivência de abelhas africanizadas igualmente foi reduzida quando expostas a doses subletais de piraclostrobina (DOMINGUES et al., 2017-2020). Redução de sobrevivência de *A. mellifera* também foi demonstrada por Fisher et al. (2017) quando expuseram as abelhas a misturas de tanque contendo diversos fungicidas. Por fim, a mistura de dois ingredientes ativos, tiofanato-metílico + clorotalonil causou toxicidade em abelhas *A. mellifera* e *Partamona helleri*, levando a mortalidade desses insetos (TOMÉ et al., 2017).

Especialmente fungicidas, que isolados não são considerados tóxicos para abelhas, quando em combinação com outros compostos podem produzir efeitos negativos para esses insetos (WADE et al., 2019). Em um cenário realista de campo, as abelhas são expostas de forma contínua a múltiplos agrotóxicos (LONG e KRUPKE, 2016; ZALUSKI et al., 2017; BOTÍAS et al., 2017), causando prejuízos para esses insetos (LAYCOCK e CRESSWELL, 2013). De acordo com McArt et al. (2017), foram encontrados resíduos de 18 agrotóxicos em pão de abelha de colmeias utilizadas na polinização dirigida em pomares de macieiras, sendo nove fungicidas, oito inseticidas e um herbicida, o que reforça o risco da exposição simultânea. Mesmo expostas a baixas doses de misturas de agrotóxicos, as abelhas desenvolvem problemas a longo prazo, razão que justifica examinar a toxicidade destas misturas em condições de campo (PRADO et al., 2019).

Espécies de abelhas que apresentam modo de vida social, usam comportamentos coletivos para combater as doenças em nível de colônia em um sistema denominado “imunidade social” (CREMER et al., 2007). Os efeitos de médio e longo prazo da exposição de abelhas a xenobiontes tem sido considerado de grande importância (FAITA et al., 2021). Neste contexto, cada abelha pode se comunicar e reagir às condições das colmeias (ninho) fazendo escolhas individuais que afetam a colmeia, de modo que ela funcione de forma coletiva, como um superorganismo (MORITZ e FUCHS, 1998). Os resultados do presente estudo concordam com o que foi postulado por Archer et al. (2014), pois as colmeias expostas a estressores, que afetam sua capacidade de manter ou restaurar a imunidade social, ficaram muito fracas a ponto de morrer, quando expostas a dois fungicidas simultaneamente. Assim, do ponto de vista tanto da conservação de abelhas como da economicidade da apicultura, os fungicidas em conjunto podem se constituir em uma ameaça a colmeia, no sentido mais amplo de um superorganismo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição de *A. mellifera* aos fungicidas Captan[®] e Zignal[®] isolados e em mistura, afetou a ultraestrutura das glândulas hipofaríngeas desses insetos, causando alterações morfológicas e estruturais nas mitocôndrias. A degeneração precoce do retículo endoplasmático rugoso também foi observada, configurando envelhecimento precoce destas organelas. Além disso, nas abelhas que ingeriram alimento contendo Captan[®], Zignal[®] e Mix, o citoplasma se mostrou heterogêneo e eletrondenso, compatível com o descrito para morte celular por necrose dessas estruturas. Não foram encontradas alterações no núcleo celular das glândulas analisadas, independentemente do tratamento. Isso precisa ser melhor investigado.

Não foram detectadas diferenças significativas nas características avaliadas sobre a produção de geleia real. Algumas falhas na execução de experimento foram reconhecidas como fatores que impedem uma conclusão precisa sobre o efeito dos fungicidas sobre a produção de geleia real e que para tanto, esta avaliação deve ser refeita, corrigindo os erros observados.

A exposição das abelhas aos fungicidas também ocasionou prejuízos para a força das colmeias, com redução da população de abelhas adultas, de cria aberta, de cria fechada e de alimento armazenado. Essas perdas foram potencializadas com o passar do tempo, indicando que os fungicidas testados são capazes de causar danos às colmeias a longo prazo. É relevante salientar que quando os dois fungicidas foram combinados (Captan[®] + Zignal[®]), os prejuízos observados foram ainda mais evidentes. Neste sentido, se torna legítimo inferir que misturas de fungicidas podem ser mais danosas para a saúde das abelhas e, conseqüentemente, das colônias, do que esses produtos isolados. Considerando que em condições realistas de campo é comum observar aplicações simultâneas de diferentes agrotóxicos, torna-se imprescindível melhor avaliar os riscos de misturas de agrotóxicos sobre esses importantes polinizadores.

Complementarmente, é admissível presumir que as alterações verificadas nas glândulas hipofaríngeas das abelhas desse trabalho, tenham propiciado os prejuízos apurados nos parâmetros da força das colmeias. Portando, compreende-se que os avanços obtidos no presente estudo, apontam que doses de campo ou subletais de Captan[®] e Zignal[®] produzem efeitos negativos sutis sobre as abelhas, que refletem no coletivo, podendo comprometer a sobrevivência das colmeias a longo prazo.

8 CONCLUSÕES

A exposição de *Apis mellifera* aos fungicidas Captan® e Zignal® isolados e em combinação: (1) alterou a morfologia e estrutura das mitocôndrias, (2) causou degeneração do retículo endoplasmático rugoso e morte celular das células do citoplasma das glândulas hipofaríngeas das abelhas e (3) ocasionou a redução da população adulta, de cria aberta, de cria fechada e do alimento armazenado nas colmeias.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ). Disponível em: <http://www.abpm.org.br/valor-nutricional/>. Acesso em: 24 ago. 2020.

ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Microbiologia ambiental**, v. 12, n. 3, pág. 774-782, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x>

ALBARRACÍN, V. N. et al. Aceitação de larvas de diferentes grupos genéticos de *Apis mellifera* na produção de abelhas rainhas. **Arch. Latinoam. Prod. Anim**, v. 14, n. 2, p. 33-41, 2006.

ARCHER, C. R. et al. Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. **Functional ecology**, p. 913-923, 2014. <https://www.jstor.org/stable/24033574>

BATISTA, A. C. et al. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees. **Journal of Apicultural Research**. 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>

BERENBAUM, M. R.; LIAO, Ling-Hsiu. Honey Bees and Environmental Stress: Toxicologic Pathology of a Superorganism. **Patologia Toxicológica**, v. 47, n. 8, pág. 1076-1081, 2019. <https://doi.org/10.1177/0192623319877154>

BERENBAUM, May R.; JOHNSON, Reed M. Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. **Current opinion in insect science**, v. 10, p. 51-58, 2015.

BERNAUER, O. M. et al. Colonies of Bumble Bees (*Bombus impatiens*) Produce Fewer Workers, Less Bee Biomass, and Have Smaller Mother Queens Following Fungicide Exposure. **Insetos**, v. 6, n. 2, pág. 478-488, 2015. <https://doi.org/10.3390/insects6020478>

BHALLI, J. A. et al. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 143–148, 2006.

BIENEFELD, K. et al. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects — A BLUP-Animal Model approach. **Apidologie**, v. 38, n. 1, pág. 77-85, 2007. <https://doi.org/10.1051/apido:2006050>

BIRELEY, R. et al. Prefácio: Preface: Workshop on Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Non-*Apis* Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, pág. 1-3, 2019. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy134>

- BITTENCOURT, C. C. et al. A cadeia produtiva da maçã em Santa Catarina: competitividade segundo produção e packing house. **Rev. Adm. Pública**, Rio de Janeiro, v. 45, n.4, p.1199-1222, ago. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0034-76122011000400013>
- BOYLE, N. K. et al. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-Apis bees: foundation and summaries. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy103>
- BRANDT, Ulrich et al. Uncoupling activity and physicochemical properties of derivatives of fluazinam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1101, n. 1, p. 41-47, 1992.
- BREEZE, T. D. Pollination services in the UK: how important are the honeybees? **Agric. Ecosyst. Environ**, v. 142, p. 137-143, 2011.
- BLUM, M. S. et al. 10-hydroxy- Δ^2 -decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. **Science**, v. 130, n. 3373, p. 452-453, 1959. DOI: 10.1126 / science.130.3373.45
- BOTÍAS, C. et al. Quantifying exposure of wild bumblebees to mixtures of agrochemicals in agricultural and urban landscapes. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 73-82, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.001>
- CALATAYUD-VERNICH, P. et al. A two-year monitoring of pesticide hazard in-hive: High honey bee mortality rates during insecticide poisoning episodes in apiaries located near agricultural settings. **Chemosphere**, v. 232, p. 471-480, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.170>
- CALABRESE, Edward J.; BALDWIN, Linda A. Can the concept of hormesis Be generalized to carcinogenesis? **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 230-241, 1998.
- CALABRESE, Edward J. Evidence that hormesis represents an “overcompensation” response to a disruption in homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, n. 2, p. 135-137, 1999.
- CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** EPSJV/Expressão Popular, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/26221>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- CHAVES, A. et al. Effects of glyphosate-based herbicide on royal jelly production of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in field conditions. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 2, p. 277-279, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844463>
- COWLES, R. S.; EITZER, B. D. Residues of neonicotinoid insecticides in pollen and nectar from model plants. **Journal of Environmental Horticulture**, v. 35, n. 1, pág. 24-34, 2017. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-35.1.24>
- CUNHA D. A. da S.; NÓBREGA, M. A. dos S.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F. Insetos Polinizadores em Sistemas Agrícolas **Ensaios e ciência**. v. 18, n. 4, p. 185–194, 2014.

CHEN, Ya-Li et al. Activity of the dinitroaniline fungicide fluazinam against *Bipolaris maydis*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 148, p. 8-15, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.005>

CRAILSHEIM, K. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 1, p. 55-60, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00258746>

CREMER, S. et al. Social Immunity. **Biologia atual**, v. 17, n. 16, pág. R693-R702, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>

DA CRUZ LANDIM, C. Glândulas exócrinas presente nos adultos das abelhas sociais. **Naturalia (São José do Rio Preto)**, p. 79-84, 1992.

DECOURTYE, A. et al. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 59, n. 3, p. 269-278, 2003. <https://doi.org/10.1002/ps.631>

DECOURTYE, A. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 57, n. 3, p. 410-419, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.001>

DEGRANDI-HOFFMAN, G. et al. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v. 4, n. 1, pág. 71-89, 2013. <https://doi.org/10.3390/insects4010071>

DEGRANDI-HOFFMAN, Gloria. et al. Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. **Journal of economic entomology**, v. 108, n. 6, pág. 2518-2528, 2015. <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 49-57, 2005. <https://doi.org/10.1051/apido:2004068>

DESNEUX, N. et al. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 81-106, 2007. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

DESJARDINS, N. S. et al. A common fungicide, Pristine®, impairs olfactory associative learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Pollut. Nov* 1;288:117720. 2021. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117720.

DELAPLANE, K. S. et al. E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. **Journal of Apicultural Research**, 52(1). 2013. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>

DI PRISCO, Gennaro et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, pág. 18466-18471, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110>

DIMOU, M. et al. **Pollen analysis of Royal jelly as a means to determine the geographical origin of royal jelly.** Aristotle University of Thessaloniki, 2007. <https://doi.org/10.1080/00173130701393874>

DING, Wen-Xing et al. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 42373-42378, 2012.

DOOLITTLE, G.M. Doolittle's queen rearing methods. *Am. Bee J.*, Hamilton, v.39, n.28, p.435-436. 1899.

DOMINGUES, C. E. C. et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>

DOMINGUES, C. E. C. et al. Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. **Environmental Pollution**, v. 266, parte 2, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>

ELAIDY, Waleed Khaled Muhammad. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers with age. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 3, p. 377-384, 2014. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.3.05>

EARDLEY, C. et al. Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice. [S.l: s.n.], 2006. Disponível em: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093318249.html>.

EL AGREBI, N. et al. Belgian case study on flumethrin residues in beeswax: Possible impact on honeybee and prediction of the maximum daily intake for consumers. **Science of The Total Environment**, v. 687, p. 712-719, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.493>

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/02/11/colheita-da-maca-inicia-em-santa-catarina>. Acesso em: 24 ago. 2010.

FAITA, M. R. et al. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. **Chemosphere**, 211, 566–572. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere>.

FAITA, Márcia Regina. et al. Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. **Chemosphere**, p. 133334, 2021.

Faita, M.R.; Chaves, A.; Nodari, R.O. The expansion of agribusiness: harmful impacts of deforestation, pesticides and transgenics on bees. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, v. 57, p.79-105, 2021. <https://doi.org/10.5380/dma.v56i0.76157>

FISHER, A. et al. The Synergistic Effects of Almond Protection Fungicides on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Forager Survival. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 3, pág. 802-808, 2017. <https://doi.org/10.1093/jee/tox031>

FORBES, Valery E. Is hormesis an evolutionary expectation. **Functional Ecology**, v. 14, n. 1, p. 12-24, 2000.

FORISTER, M. L. et al. Increasing neonicotinoid use and the declining butterfly fauna of lowland California. **Biology Letters**, v. 12, n. 8, pág. 20160475, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0475>

FREITAS, B. M; NUNES-SILVA, P. Polinização agrícola e sua importância no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. et al. (eds.). Polinizadores no Brasil-contribuições e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP, 2012. p. 113-118.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332–346, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/2009012>

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810–821, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>

GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32p. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46).

GHINI R.; KIMATI H. Resistência de fungos a fungicidas. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 2000. 78p. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/13231>

GILBURN A. S.; et al. 2015. Are neonicotinoid insecticides driving declines of widespread butterflies?. *PeerJ* 3: e1402. <https://doi.org/10.7717/peerj.1402>

GIANNINI, T.C. et al. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 108: 849-857. 2015. doi: 10.1093/jee/tov093

GOULSON, Dave. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, pág. 977-987, 2013.

GONÇALVES, L. S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. Mensagem Doce, №. 87. 2006. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/87/msg87.htm>. Acesso em: 24 ago. 2020.

GUILLÉN, D. et al. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 236–252, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.064>

GUO, Ze-jian et al. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1056, n. 1, p. 89-92, 1991.

HAYDAK, M. H. Larval Food and Development of Castes in the Honeybee. **Journal of Economic Entomology**, v. 36, n. 5, pág. 778-792, 1943. <https://doi.org/10.1093/jee/36.5.778>

- HAYDAK, M.H. (1970) Honey Bee Nutrition. **Annual Review of Entomology**, 15, 143-156. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>
- HATJINA, Fani et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 467-480, 2013.
- HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of insect Physiology**, v. 44, n. 10, pág. 929-939, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00058-4)
- HUANG, Z. Y.; OTIS, G. W.; TEAL, P. E. A. Nature of Brood Signal Activating the Protein-Synthesis of Hypopharyngeal Gland in Honey Bees, *Apis-Mellifera* (Apidae, Hymenoptera). **Apidologie**, v. 20, n. 6, p. 455–464, 1989.
- HSU, Chin-Yuan; QIU, J. T.; CHAN, Yu-Pei. Cellular degradation activity is maintained during aging in long-living queen bees. **Biogerontology**, v. 17, n. 5-6, p. 829-840, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10522-016-9652-x>
- HOU, Yi-Ping et al. Impact of fluazinam on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 155, p. 81-89, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.009>
- IBGE (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2018/2020. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotrop.*, v. 10, n. 4, p. 59–62, 2010.
- JOHNSON, Reed M. et al. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54092, 2013.
- JOHNSON, Dennis A.; ATALLAH, Zahi K. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 755-758, 2006.
- JUMARIE, C. et al. Misturas de herbicidas e metais afetam o sistema redox das abelhas. **Chemosphere**, v. 168, p. 163-170, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. Editora Guanabara Koogan. Ed. 7. Rio de Janeiro, 2000.
- LADURNER, E. et al. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 36, n. 3, pág. 449-460, 2005. <https://doi.org/10.1051/apido:2005032>
- LAYCOCK, I.; CRESSWELL, J. E. Repression and Recuperation of Brood Production in *Bombus terrestris* Bumble Bees Exposed to a Pulse of the Neonicotinoid Pesticide Imidacloprid. **PloS one**, v. 8, n. 11, pág. e79872, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079872>

LEITE, D. T. et al. Toxicity of Fenpyroximate, Difenconazole and Mineral Oil on *Apis mellifera* L. Introduction. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 737-743, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3416>

LIAO, Ling-Hsiu et al. Fungicide suppression of flight performance in the honeybee (*Apis mellifera*) and its amelioration by quercetin. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1917, p. 20192041, 2019. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2041>

LIU, Je-Ruei et al. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11447-11452, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf802494e>

LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12/01/2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms11629>

LUKENS, Raymond J. **Chemistry of fungicidal action**. Springer Science & Business Media, 2013.

KARISE, R. et al. Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments. **Chemosphere**, v. 188, p. 389-396, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.013>

KIST, B. B. et al. Anuário brasileiro da maçã (2019). Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019. 56 p. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/wp-content/uploads/2019/06/anuario2019.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

KEULEMANS, J. et al. Fruit weight in apple as influenced by seed number and pollinizer. **Acta Horticulturae**, v.42, p.201-210, 1996.

KOSHIO, S. ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real pura e adicionada a mel brasileiro. **Química Nova**, v. 26, p. 670-673, 2003.

KOVAC, H. et al. Thermoregulation of water foraging honeybees—Balancing of endothermic activity with radiative heat gain and functional requirements. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 12, p. 1834-1845, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.08.002>

KOVALESKI, A.; DOS SANTOS, R. S. S. Manejo sustentável da mosca das frutas sul americana (*A. fraterculus* W. 1830) na região Sul do Brasil. Anais. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves. 2012.

KLEIN, A.-M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 274, n. 1608, p. 66, 95–96, 191, 2007.

KREMEN, C. Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits? Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 115–124.

KRUPKE, C. H. et al. Múltiplas rotas de exposição a pesticidas para abelhas que vivem perto de campos agrícolas. **PLoS one**, v. 7, n. 1, pág. e29268, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>

KHOURY, David S. et al. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18491, 2011.

MACEDO, Liliane Maria Fróes de. Efeitos do CO2 sobre a senescência e ativação dos ovários de *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, SP. 2009.

MAGALHÃES, LEONARDO C. et al. Development and reproduction of the predator *Podisus distinctus* (Stal)(Heteroptera: Pentatomidae) exposed to sublethal doses of permethrin. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2002.

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A. L. Forage behaviour of bees and other insects on mango flowers (*Mangifera indica* L.) and fruit production. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 31, n. 3, p. 335-341, 2009. doi: 10.4025/actascianimsci.v31i3.6678

MARCHINI, L. C. et al. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência rural**, v. 36, n. 3, p. 949-953, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000300034>

MCCLESKEY, C. S.; MELAMPY, R. M. Bactericidal properties of royal jelly of the honeybee. **Journal of economic entomology**, v. 32, n. 4, p. 581-587, 1939. <https://doi.org/10.1093/jee/32.4.581>

MCART, S. H. et al. High pesticide risk to honey bees despite low focal crop pollen collection during pollination of a mass blooming crop. **Scientific Reports**, v. 7, p. 46554, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46554>

MICHENER, C. D. The bees of the world. [S.l: s.n.], 2000. v. 85. Disponível em: As Abelhas do Mundo - Charles Duncan Michener - Google Livros

MOUGA, da S. D. et al. Bees and plants in a transition area between atlantic rain forest and araucaria forest in southern Brazil. **Revue d'écologie**, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/2042/55924>

MORSE, Joseph G. Agricultural implications of pesticide-induced hormesis of insects and mites. **Human & experimental toxicology**, v. 17, n. 5, p. 266-269, 1998.

MULLIN C.A. et al. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. **PLoS ONE** 5(3): e9754. 2010. doi:10.1371/journal.pone.0009754

MULLIN, C. A. et al. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. **Frontiers in public health**, v. 4, p. 92, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00092>

NAKANISHI, K. et al. Were the sharp declines of dragonfly populations in the 1990s in Japan caused by fipronil and imidacloprid? An analysis of Hill's causality for the case of *Sympetrum frequens*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, pág. 35352-35364, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3440-x>

NEGRI, P. et al. Towards Precision Nutrition: A Novel Concept Linking Phytochemicals, Immune Response and Honey Bee Health. **Insects**, v. 10, n. 11, p. 401, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10110401>

NICODEMO, D. et al. Mitochondrial Respiratory Inhibition Promoted by Pyraclostrobin in Fungi is Also Observed in Honey Bees. **Environmental Toxicology**, v. 39, n. 6, pág. 1267-1272, 2020. <https://doi.org/10.1002/etc.4719>

OECD/OCDE, Guidelines For The Testing Of Chemicals Number 213, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, OECD. Environmental Health and Safety Division, Paris. 1998a.

OECD/OCDE, Guidelines For The Testing Of Chemicals Number 214, Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, OECD. Environmental Health and Safety Division, Paris. 1998b.

OEPP/EPPO, Revised draft of EPPO Guidelines PP 1/170: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: side effects on honeybees. Apendice 1. 2001.

OHASHI, Kazuaki. et al. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. **European journal of biochemistry**, v. 249, n. 3, p. 797-802, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00797.x>

OSTIGUY, N. et al. Honey Bee Exposure to Pesticides: A Four-Year Nationwide Study. **Insects**, v. 10, n. 1, pág. 13, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10010013>

PATRON, E. Polinización con abejas. In: BESSONE, J. F. (ed.). Editorial Campo; Abejas - Edición especial: Polinización. Agência Periodística CID. Buenos Aires, Argentina. 2010.

PEREIRA, Lilian Cristina. et al. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1-2, p. 1-14, 2012.

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PloS one**, v. 8, n. 7, pág. e70182, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

POQUET, Y. et al. Modulation of pesticide response in honeybees. **Apidologie**, v. 47, n. 3, pág. 412-426, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0429-7>

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, pág. 345-353, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

PRADO, A. et al. Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 1250-1260, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.102>

PRADO, F. S. R. et al. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, p. 114313, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114313>

REMBOLD, H. et al. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera* **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 2, pág. 307-314, 1974. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(74\)90225-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90225-X)

SANCHEZ-BAYO, Francisco; GOKA, Koichi. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PLoS one**, v. 9, n. 4, pág. e94482, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>

SANDROCK, Christoph et al. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. **PLOS one**, v. 9, n. 8, p. e103592, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103592>

SCARIOT, Fernando J. et al. Necrotic and apoptotic cell death induced by Captan on *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 1-7, 2017.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, n. 4, p. 287-293, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF00299306>

SIMON-DELISO, N. et al. Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. **PLoS one**, v. 9, n. 7, pág. e103073, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103073>

SOSTER, M. T. B.; LATORRE, A. N. Avaliação da fenologia das cultivares de macieira Imperatriz, Gala e Fuji em pomar em Bom Retiro – SC. **Revista Biotemas**, 20: 35-40. 2007.

SCHOTT, Matthias et al. Honeybee colonies compensate for pesticide-induced effects on royal jelly composition and brood survival with increased brood production. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

SGOLASTRA, F. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Solitary Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, pág. 22-35, 2019. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy105>

SMET, L. et al. Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. **PLoS ONE**, 12, e0171529. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171529>

ŠKERL, Maja Ivana Smodiš; GREGORC, Aleš. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v. 41, n. 1, p. 73-86, 2010. <https://doi.org/10.1051/apido/2009051>

TADEI, R., et al. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Sci Rep** **9**, 3277. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

TAVARES, Daiana Antonia et al. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386-393, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.092>

TOLEDO, V. de A. A. et al. Produção de geleia real em colônias de abelhas africanizadas considerando diferentes suplementos proteicos e a influência de fatores ambientais. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 1, p. 101-108, 2010. DOI: 10.4025/actascianimsci.v32i1.6836

TOLEDO, V. de A. A. et al. Polinização por abelhas em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 4, p. 236-246, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v12n4p236-246>

TOMÉ, H. V. V. et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 1, pág. 160866, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

TOMÉ, H. V. V. et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society open science**, v. 4, n. 1, pág. 160866, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

TOSI, S.; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on the abelhas. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1900, pág. 20190433, 2019. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433>

TRAYNOR, K. S. et al. In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33207, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep33207>

USEPA, PMRA et al. Guidance for assessing pesticide risks to bees. **Office of Chemical Safety and Pollution Prevention Office of Pesticide Programs Environmental Fate and Effects Division, Environmental Protection Agency, Washington DC; Environmental Assessment Directorate, Pest Management Regulatory Agency, Health Canada, Ottawa, CN; California Department of Pesticide Regulation**, 2014. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-06/documents/pollinator_risk_assessment_guidance_06_19_14.pdf

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. et al. **Manual de identificação e controle de doenças, pragas e desequilíbrios nutricionais da macieira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/33891157.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

VÉLEZ, Mayra et al. Impacto induzido por spinosad e deltametrina no acasalamento e na produção reprodutiva do milho weevil *Sitophilus zeamais*. **Revista de entomologia econômica**, v. 111, n. 2, p. 950-958, 2018.

VIANA B. F. et al. Plano de manejo para polinização de macieiras da variedade Eva: conservação e manejo de polinizadores para a agricultura sustentável, através de uma abordagem ecossistêmica / Rio de Janeiro: Funbio, 2015. Disponível em: www.mma.gov.br

VIEIRA, G. H. da C.; SILVA R. F. R. da; GRANDE J. P. Uso da apicultura como fonte alternativa de renda para pequenos e médios produtores da região do Bolsão, MS. In: Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2. Belo Horizonte, Minas Gerais. Anais. 2004.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, pág. R117-R124, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>

VITORATOS, Andrew G. Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 11-12, p. 737-746, 2014.

WADE, A. et al. Combined Toxicity of Insecticides and Fungicides Applied to California Almond Orchards to Honey Bee Larvae and Adults. **Insects**, v. 10, n. 1, pág. 20, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10010020>

WANG, Y. et al. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2016. DOI: 10.1007/s13592-015-0374-x

WATKINS, R. Apple and pear. In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. (eds). Evolution of crop plants. Londres: Longman, p. 418-422. 1995.

WIESE, H. Apicultura: novos tempos. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 378 p.

WINSTON, M. L. The biology of the honey bee Harvard Univ. **Press Cambridge, MA Google Scholar**, 1987.

WINSTON, Mark L.; et al. Absconding Behaviour of the Africanized Honeybee in South America. **Journal of Apicultural Research**. v. 18, n. 2, pág. 85-94, 1979. <https://doi.org/10.1080/00218839.1979.11099951>

WERNECKE, Anna et al. Inert agricultural spray adjuvants may increase the adverse effects of selected insecticides on honey bees (*Apis mellifera* L.) under laboratory conditions. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 129, n. 1, p. 93-105, 2022.

WRIGHT, G. A.; NICOLSON, S. W.; SHAFIR, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. **Annual Review of Entomology**, v. 63, 2018. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-020117-043423>

WU, Judy Y. ANELLI, et al. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e14720, 2011.

WU, Ming-Cheng et al. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 88, p. 12-20, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>

YANG, Chao et al. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **International Scholarly Research Notices**, v. 2011, 2011.

YANG, W. et al. Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. **PeerJ**, v. 5, p. e3118, 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3118>

ZALUSKI, R.; et al. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>

ZALUSKI, R. et al. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. **Relatórios científicos**. v. 10, n. 1, pág. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59070-8>

ZANUNCIO, Teresinha Vinha et al. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stål, 1860)(Heteroptera: Pentatomidae). **Crop Protection**, v. 22, n. 7, p. 941-947, 2003.

ZHANG, WenJun. Uso global de pesticidas: Perfil, tendência, custo / benefício e muito mais. **Procedimentos da Academia Internacional de Ecologia e Ciências Ambientais**, v. 8, n. 1, pág. 1, 2018.

ZHU, W. et al. Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. **PloS um**, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>