

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

WILLIAM CRISTIAN DA SILVA PIZZAIA

Rainhas *Apis mellifera* africanizadas tolerantes a inseticida
neonicotinoide

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO - 2016

WILLIAM CRISTIAN DA SILVA PIZZAIA

Rainhas *Apis mellifera* africanizadas tolerantes a inseticida
neonicotinoide

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2016

PÁGINA DESTINADA À FOLHA DE APROVAÇÃO. ENCONTRA-SE NA
SECRETARIA DO PGM

A toda minha família, por fazer parte de mim.
À minha esposa, por estar sempre ao meu lado em todas as decisões.
Aos meus amigos, que me ensinam o poder da convivência.
A todos os que acreditaram e aos que duvidaram de minhas escolhas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer nesta etapa tão importante de minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) por toda colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

A professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, por toda orientação e incentivo durante a pesquisa.

Aos coorientadores, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin e professor doutor Erasmo Renesto, por todo incentivo e apoio.

BIOGRAFIA

WILLIAM CRISTIAN DA SILVA PIZZAIA, filho de Vanderlei Kondratoski Pizzaia e de Neide Maria da Silva Pizzaia, nasceu em 02 de junho de 1983, na cidade de Itaquera, estado de São Paulo.

Em dezembro de 1997, concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio Estadual Tiradentes, na cidade de Umuarama, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 2000, no Colégio Estadual Pedro II, na cidade de Umuarama, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em fevereiro de 2004, na Faculdade Global de Umuarama (FGU), na cidade de Umuarama, estado do Paraná, obtendo o título de Biólogo em janeiro de 2007.

Ingressou no Curso de Pós Graduação em Análises Clínicas, em fevereiro de 2011, na Faculdades Integradas de Jacarepaguá (FIJ), na cidade de Ariquemes, estado de Rondônia, obtendo o título de especialista em análises clínicas em março de 2012.

Em fevereiro de 2014, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Origem e evolução das abelhas.....	3
2.2. Desordem de colapso de colônia.....	5
2.3. Neonicotinoide: tiametoxam.....	6
2.4. Melhoramento genético em abelhas.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Coleta das abelhas.....	11
3.2. Produção de rainhas filhas.....	11
3.3. Montagem dos bioensaios.....	12
3.4. Diluição e aplicação do neonicotinoide tiametoxam.....	13
3.5. Análise em campo.....	13
3.6. Teste de toxicidade.....	14
3.7. Concentração crítica de eletrólitos (CEC).....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Comportamento após contaminação crônica com tiametoxam.....	16
4.2. Produção de rainhas tolerantes ao tiametoxam.....	20
4.3. Testes para validar a geração F4 de rainhas tolerantes ao tiametoxam....	22
4.3.1. Toxicidade do tiametoxam na F4.....	22
4.3.2. Concentração crítica de eletrólitos.....	23
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –Teste de toxicidade por contato	22
Quadro 2 - Respostas de Basofilia nuclear de glândulas hipofaringeanas e de cérebro de <i>Apis mellifera</i>	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Material para coleta de enxames	11
Figura 2 - Papel filtro com tiametoxam 1% inserido no núcleo	12
Figura 3 - Identificação do núcleo.....	13
Figura 4 - Papel filtro com tiametoxam 1% inserido no núcleo	16
Figura 5 - Remoção de papel filtro pelas abelhas	17
Figura 6 - Abelhas operárias mortas no fundo do núcleo	17
Figura 7 - Abandono do núcleo	18
Figura 8 - Abandono do núcleo	18
Figura 9 - Armazenamento de mel, pólen e crias em desenvolvimento	19
Figura 10 - Crias em desenvolvimento	19
Figura 11 - Formação de realeiras nos núcleos	20

RESUMO

PIZZAIA, William Cristian da Silva, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2016. **Seleção de rainhas *Apis mellifera* africanizadas tolerantes à inseticida neonicotinoide.** Professora orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Coorientadores: Claudete Aparecida Mangolin, Erasmo Renesto.

A interação entre as abelhas e as plantas garantiu aos vegetais o sucesso na polinização cruzada, aumentando o vigor das espécies, bem como a produção de frutos e sementes. As abelhas são os principais agentes polinizadores das angiospermas e das culturas agrícolas e um dos principais motivos do desaparecimento das abelhas de áreas agrícolas é o uso excessivo ou incorreto de inseticidas. No entanto, a agricultura é extremamente dependente do uso de agrotóxicos utilizados com finalidade de deter pragas das mais diversas lavouras. O uso destes produtos químicos acaba atingindo insetos polinizadores, como as abelhas *Apis mellifera*. O *Colony Collapse Disorder* associado a inseticidas tem agravado a cada dia a vida das abelhas. Este trabalho de pesquisa teve como objetivos selecionar abelhas rainhas de *A. mellifera* africanizadas, tolerantes ao neonicotinoide tiametoxam, produzir quatro gerações de abelhas mantidas em contaminação crônica a esse inseticida e realizar testes para validar a tolerância ao neonicotinoide tiametoxan. Foram montados bioensaios em um apiário na Fazenda Experimental de Iguatemi e as abelhas foram submetidas a um contato com papel filtro embebido com o inseticida neonicotinoide. A seleção de rainhas foi realizada mantendo até as gerações parentais F4. As abelhas *A. mellifera* foram submetidas a teste de toxicidade, em B.O.D., por 24 horas, em concentração crítica de eletrólitos (C.E.C.), para a avaliação da evolução da tolerância ao inseticida neonicotinoide. Os resultados obtidos mostraram que abelhas se tornaram tolerantes ao inseticida neonicotinoide tiametoxam após seleção de 4 gerações de *A. mellifera* mantidas em concentrações subletais do inseticida.

Palavras-chave: Toxicologia genética, tiametoxam, seleção de rainhas.

ABSTRACT

PIZZAIA, William Cristian da Silva, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, February, 2016. **Selection queens *Apis mellifera* Africanized tolerant neonicotinoid insecticide.** Adviser: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Erasmo Renesto.

The interaction between bees and plants assured vegetables success in cross-pollination, increasing the vigor of the species, and increasing the production of fruits and seeds. Bees are the main pollinators of flowering plants and crops and one of the main reasons for the disappearance of the agricultural areas of bees is excessive or incorrect use of insecticides. However agriculture is heavily dependent on the use of pesticides used in order to deter pests of various crops. The use of pesticides affects pollinating insects like bees *Apis mellifera*. *Colony Collapse Disorder* associated with insecticides has caused damage to life of bees. This research aimed to select queen bees *A. mellifera* africanized tolerant to neonicotinoid Thiamethoxam, produced four generations of bees kept in chronic contamination to that insecticide and perform tests to validate tolerance. Bioassays were mounted in an apiary in Iguatemi Experimental Farm where bees were subjected to a contact with neonicotinoid insecticide on filter paper. Selection of queens was carried out maintaining the parental generations to F4 which were subjected to 24 hour toxicity test in B.O.D. and critical electrolyte concentration (C.E.C.) for evaluation of tolerance to the insecticide neonicotinoid. The results showed that bees have become tolerant to neonicotinoid insecticide Thiamethoxam after four generations of selection kept in sublethal concentrations of insecticide.

Keywords: Genetic toxicology, thiamethoxam, queen selection.

1. INTRODUÇÃO

A interação entre as abelhas e as plantas garantiu aos vegetais o sucesso na polinização cruzada, que constitui uma importante adaptação evolutiva das plantas (Couto e Couto, 2002). A polinização representa fundamental importância na condução de muitas culturas agrícolas. Entre os insetos polinizadores, destacamos as abelhas *Apis mellifera* que realizam boa parte da polinização entomófila. A dieta dessas abelhas inclui pólen e néctar de plantas dos mais diversos grupos, já que se trata de uma espécie altamente generalista. Além disso, as colônias de abelhas melíferas são numerosas, atingindo mais de 100 mil indivíduos (Winston, 2003).

Apesar da importância da polinização, a agricultura é extremamente dependente do uso dos agroquímicos. A redução ou ausência do uso destes causaria queda na produção agrícola, aumento nos custos de produção e elevação dos preços entre outros fatores (Knutson, 1999). Assim, inseticidas, herbicidas e fungicidas são usados para melhorar a produção agrícola.

Um grupo de inseticidas muito utilizados são os neonicotinoides, por serem eficientes para o controle de insetos que se tornam pragas nas lavouras. Contudo, afetam os polinizadores, em especial as abelhas. Elas acabam perdendo seu senso de direção e localização, agregando mais uma causa à CCD (*Colony Collapse Disorder*), que é um distúrbio multifatorial. A desorientação ocorre pelo fato desse agrotóxico atuar no sistema nervoso dos insetos, promovendo uma excitação que pode causar câimbras e complicações na comunicação, como sua dança de localização, tanto por bloqueio quanto por liberação de receptores neurais (Fischer et al., 2014).

Os resíduos de neonicotinoides podem estar presentes no pólen e néctar das culturas tratadas. O contato com este produto apresenta impactos negativos como comprometimento da fisiologia, habilidades cognitivas, incluindo forrageamento, comportamento e memória das abelhas visitantes e forrageadoras das plantas tratadas com esses inseticidas (Gontijo, 2003; Sandrock et al., 2014).

As abelhas vão a locais muito distantes em busca de alimento. Quando retornam ao ninho, utilizam uma dança para informar onde localizaram o alimento, repassando as coordenadas para as demais operárias. Essa comunicação atinge as áreas cognitivas e o contato com inseticidas neonicotinoides podem ocasionar

bloqueio em sua comunicação sináptica, impedindo-a de localizar o ninho após a coleta de forrageamento (Fischer et al., 2014).

O melhoramento genético de abelhas é uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento apícola, reforçando o manejo adequado, tendo a troca de rainhas e a inseminação instrumental como bases para a seleção e o aumento do progresso genético, principalmente de características quantitativas (Martinez et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivos selecionar abelhas rainhas de *A. mellifera* africanizadas tolerantes ao neonicotinoide tiametoxam, produzir quatro gerações de abelhas mantidas em contaminação crônica com esse inseticida e realizar testes para validar a tolerância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e evolução das abelhas

As primeiras abelhas surgiram na era terciária, mesmo período em que houve constatação da presença do grão de pólen ou das angiospermas. Acredita-se que as abelhas tenham se originado a partir das vespas, que deixaram de caçar pequenos insetos e passaram a coletar néctar e pólen, realizando a função de polinizadora, mecanismo reprodutivo e evolutivo fundamental para as plantas e para o ecossistema (Winston, 2003).

Abelhas são insetos sociais que vivem em colônias e são conhecidos há mais de 40 mil anos. Encontram-se por várias regiões como África, Ásia e Europa. A técnica de realizar trabalho com a abelha e a exploração desse inseto, conhecida como apicultura, existe desde o ano 2400 a. C., sendo usualmente uma técnica racional de aproveitamento dos produtos apícolas. Gregos e egípcios apresentaram técnicas simples para a coleta do produto apícola, o que ganhou aperfeiçoamento no final do século XVII (Crane, 1999; Winston, 2003).

A influência mútua entre o homem e as abelhas já se estende ao longo dos tempos, podendo ser expressa por meio das gravuras em cavernas datadas de 7.000 anos a. C., mostrando a coleta de mel nos ninhos silvestres. A forma de coleta era rudimentar e não apresentava cuidados com o enxame, o que não garantia o desenvolvimento do mesmo. O manejo foi aprimorado ao longo do tempo com as técnicas desenvolvidas e a necessidade do homem consumir produtos apícolas (Crane, 1999).

Para ocorrer o desenvolvimento e evolução das abelhas dois fatores foram de grande importância, a habilidade de poderem agrupar-se e a capacidade de manter a temperatura ideal da colônia de forma independente da temperatura externa, o que permitiu às abelhas uma boa disseminação ao longo dos tempos, tanto nos trópicos quanto em climas temperados (Ruttner, 1978; Mello et al., 2003).

As abelhas colonizaram vários lugares, o que as colocou em condições ecológicas diferentes e desafiadoras, numa dinâmica e sistêmica luta pela sobrevivência que, associado ao isolamento geográfico, propiciou um fator de adaptação das subespécies de *A. mellifera*, caracterizando estes grupos como

ramos ou linhagens evolutivas (Ruttner, 1978). A origem da *A. mellifera* é a África, migrando em seguida para a Ásia e Europa, o que desencadeou a formação de muitas subespécies que apresentavam morfologia, comportamento e fisiologia de forma bem distintas. O ser humano apresentou um bom domínio ao longo dos tempos com a apicultura, o que garantiu mais hibridação intraespecífica, como ocorreu no Continente Americano (Parker et al., 2010).

O desenvolvimento da apicultura nacional se expressa pelo tamanho do território que é ofertado, com um clima propício e floradas diversificadas, e que, com o manejo adequado, tem garantido alta produção ao longo dos tempos desde a introdução da *A. mellifera* (Couto e Couto, 2002).

Estima-se que o desenvolvimento na cadeia de produção foi maior com a africanização das abelhas, introdução das abelhas *A. m. scutellata* ou abelha africana, no ano de 1956, ocorrendo acasalamento natural com as abelhas de outras subespécies, introduzidas anteriormente, originando as abelhas africanizadas que se dispersaram por todo continente (Mello et al., 2003).

No Brasil, as abelhas chegaram no ano de XIX, com a imigração europeia e, no ano de 1839, chegam no Rio de Janeiro as abelhas pretas ou *A. m. mellifera*. No Rio Grande do Sul, aparecem as abelhas *A. m. ligustica*, introduzidas pelos imigrantes alemães no ano de 1879. A disseminação ao longo do território brasileiro se deu com a entrada de outras espécies pelos europeus, as quais foram denominadas *A. mellifera* (Kerr, 1967).

A eficiência da polinização tem sido comprometida ao longo dos anos com a utilização dos inseticidas, como o neonicotinoide tiametoxam, tendo se agravado cada vez mais e aumentando a preocupação mundial a respeito da sobrevivência dos polinizadores, como a *A. mellifera* (Samson-Robert . et al., 2014).

Abelhas apresentam características de cooperação mútua, as quais não são encontradas em outros animais. Ao se observar uma colônia, há uma constatação de que a perfeita atividade de trabalho das abelhas, desde a produção dos favos até a produção e armazenamento de mel, vai muito além do imaginável. Neste trabalho, destacam três membros importantes: a rainha, as operárias e os zangões (Winston, 2003).

Para um homem do campo, a apicultura é uma forma de renda, de ocupação para sua vida e de contribuição com o meio ambiente, pois, além de ser uma atividade de baixo custo, se comparada a outros trabalhos agrícolas, as abelhas

contribuem para o equilíbrio do ecossistema e para a manutenção da biodiversidade. A apicultura nos oferece vários produtos, além de ajudar o aumento da produção das culturas (Araújo, 1982).

Em condições favoráveis, de intensa florada, as abelhas coletam e armazenam alimento, mas, em períodos de escassez de néctar, pode ocorrer a diminuição das suas atividades, ocasionando a redução da postura da rainha e um desequilíbrio da população na colmeia. Em tais circunstâncias, é essencial a interferência do apicultor, sob o risco de perda de enxames ou enfraquecimento geral das colônias. Muitas dietas oferecidas às abelhas até suprem o valor nutritivo do pólen, mas quando as abelhas têm uma livre escolha entre o pólen e o substituto, elas geralmente têm maior preferência pelo primeiro do que o segundo (Castagnino, 2006).

2.2. Desordem de colapso de colônia

A Desordem de Colapso de Colônia (CCD) ou *Colony Collapse Disorder* caracteriza-se por apresentar o desaparecimento das abelhas operárias de uma determinada colônia enquanto ainda sobrevivem no ninho a abelha rainha e as crias. Vários fatores estão relacionados ao desaparecimento das abelhas, como associação de ácaros, fungos, vírus e pesticidas e também deficiência no forrageamento, além de uma rainha falha que não transmite aos seus descendentes características de resistência para sobrevivência (Fairbrother et al., 2014).

Nos Estados Unidos, foi apresentada a condição de CCD, pela primeira vez, no ano de 2006, quando houve a inferência de que diversos fatores poderiam ocasionar o desaparecimento das abelhas, de forma individual ou em conjunto, pois as colônias apresentavam condições diferentes dos problemas clássicos de outros momentos. A morte de abelhas, após o inverno, é habitual, porém, em 2007, ocorreu uma perda muito expressiva, levando à eliminação parcial ou até total de colônias ou apiários (Oldroyd, 2007; Cox-Foster e VanEngelsdorp, 2009).

Com o registro do desaparecimento das abelhas ou o fenômeno da CCD, tornou-se fator de grande relevância o estudo sobre os efeitos letais e subletais dos inseticidas em abelhas. Esses insetos sociais estão em contato constante com plantas com flores para coleta de néctar e pólen, entrando em contato com agrotóxicos. Logo, são expostas a compostos que geram graves complicações de

sobrevivência, comprometendo também o restante do enxame que se encontra na colméia e causando danos irreparáveis (Marchini, 2006; Pinheiros e Freitas, 2010).

Os declínios em populações de abelhas preocupam os pesquisadores, pois comprometem a crescente demanda de culturas a serem polinizadas, assim como das plantas nativas, uma vez que a exposição a agentes patogênicos causa uma escassez de polinizadores e efeitos negativos sobre o desenvolvimento das colônias de abelhas (Macieira, 1989; Pettis et al., 2013).

A presença de agrotóxicos na agricultura e sua utilização são de grande espectro, sendo que os mais utilizados são os herbicidas, seguido pelos inseticidas, fungicidas e por último pelos acaricidas. Os inseticidas apresentam grande toxicidade que comprometem o desenvolvimento das abelhas e as suas tarefas de manter a polinização e a continuidade na produção de alimentos e no seu desenvolvimento vital (Delgado e Paumgarten, 2004; Jardim e Andrade, 2009).

A dependência de inseticidas e de agrotóxicos, visando a controlar pragas e plantas daninhas que prejudicam o desenvolvimento agrícola, é cada vez maior na agricultura, embora estes produtos contribuam para a devastação de insetos benéficos à lavoura, como os que promovem controle biológico, dentre estes as abelhas. Esta interatividade de produtos químicos provoca o surgimento de novos compostos e pesticidas que garantem a produtividade agrícola, mas que podem determinar o CCD (Thompson, 2003; Desneux et al., 2007; Oldroyd, 2007).

Os inseticidas, de forma geral, são agressivos ao sistema nervoso central, sendo considerados neurotóxicos e responsáveis pelo comprometimento das células nervosas, transmissoras dos impulsos nervosos, impedindo a ocorrência de uma sinapse (Sandrock et al., 2014).

2.3. Neonicotinoide: tiametoxam

A utilização da nicotina para controle de insetos sugadores foi de grande importância ao longo dos tempos, com uma eficiência baixa e de grande toxicidade nos insetos. Com a descoberta dos neonicotinoides, houve uma seletividade maior com o grupo dos insetos, causando danos letais aos mesmos e não prejudicando os vertebrados, o que fomentou o mercado de inseticidas, gerando lucro cada vez maior para a indústria agrícola. (Maienfisch et al., 2001; Matsuda et al., 2001; Tomizawa; Casida, 2005; Elbert et al., 2008; Ford e Casida, 2008).

Os neonicotinoides são uma classe de inseticidas sintéticos análogos à nicotina, que é proveniente da folha do fumo, da qual já se utiliza há muito tempo como uma forma de proteção à agricultura. Tanto a nicotina quanto os neonicotinoides apresentam atuação na fenda sináptica dos insetos. Sendo comprometedores da transmissão do impulso nervoso, pois são agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina (principal neurotransmissor do sistema nervoso central do inseto), comprometem as funções vitais do inseto, causando danos que podem levá-lo à morte (Nauen et al., 2001; Rigitano; Carvalho, 2001).

A divisão do grupo de neonicotinoides pode ser feita em duas classes ou gerações: a primeira geração, composta pelas classes das cloronicotinilas, à qual pertenciam acetamiprido, imidacloprido e tiacloprido; e a segunda geração, composta por dinotefuram, clotianidina, nitenpiran e tiametoxam (Elbert et al., 2008; Nauen et al., 2003).

Neonicotinoides e alguns de seus metabólitos são agonistas potentes e atuam seletivamente sobre os receptores pós-sinápticos nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do sistema nervoso central dos insetos (Tomizawa e Casida, 2001; Tomizawa, 2013). Imitando os neurotransmissores naturais, os neonicotinoides ligam-se com elevada afinidade a estes receptores e desencadeiam uma hiperexcitação neuronal, o que pode, sob uma dose letal, levar o inseto a efeitos neurotóxicos (Tomizawa e Casida, 2001). Sob doses subletais, as abelhas começaram a sucumbir 15 dias após a exposição inicial (Moncharmont et al., 2003).

O neonicotinoide tiametoxam apresenta uma ampla forma de atuação contra insetos, principalmente os sugadores, sendo um pesticida utilizado tanto no tratamento de sementes, quanto como pesticida foliar, com uma importante característica sistêmica de atuação e comprometimento da vida do inseto (Maienfisch et al., 2001; Tomizawa e Casida, 2005).

A abelha *A. mellifera* é de grande importância para a polinização, sendo ecológica e economicamente importante ao mundo. Declínios das abelhas levam a constantes pesquisas sobre os fatores que influenciam esta queda de sobrevivência: parasitas, perda de habitat, desnutrição e com destaque os inseticidas, cuja expressão de perda se dá por maior parte ao neonicotinoides neurotóxicos e que causam o stress subletal, devido ao grande uso nas lavouras (Sandrock et al., 2014; Rand et al. 2015).

A eficiência biológica de tiametoxam é análoga a de outros inseticidas neonicotinoides, os quais comprometem o sistema nervoso central do inseto, afetando locomoção e retorno do animal a sua colônia, fazendo com que haja estímulo ao desenvolvimento dos sintomas de CCD (Wiesner; Kayser, 2000).

O tiametoxam pode ser empregado por meio de aplicação direta no solo nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva; por aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, batata, feijão, milho, soja e trigo; e por aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, cebola, citros, crisântemo, ervilha, eucalipto, feijão, fumo, melancia, melão, milho, morango, pastagens, pepino, repolho, sorgo, tomate, trigo e soja (ANVISA, 2008).

Nos últimos anos, a utilização dos neonicotinoides tem aumentado de forma sistêmica e representativa. Os neonicotinoides são inseticidas que agem no sistema nervoso central, perturbando esta via de comunicação, comprometendo movimentos e a fisiologia do inseto, pois são agonistas de receptores de acetilcolina, o que ocasiona grandes danos ao inseto, comprometendo todas as suas habilidades (Sandrock et al., 2014).

Os neonicotinoides têm afetado de forma adversa a imunidade das abelhas e, por meio da resistência metabólica, os insetos têm apresentado uma forma de tentar sobreviver ao contato com o inseticida (Rand et al. 2015).

Abelhas são muito sensíveis ao contato com inseticidas, principalmente aos neurotóxicos, como o neonicotinoide tiametoxam. Os efeitos dos inseticidas sobre os insetos podem ser devastadores, causando danos muito graves quando associados a outros compostos que fatalmente destroem a vida das abelhas. Os problemas com as habilidades, fisiologia, comportamento ficam mais agravados, identificando mais um caminho ao CCD (Williamson et al., 2013).

Nos últimos anos de pesquisa com as abelhas, o declínio dos polinizadores tem se expressado de forma gigantesca, o que gera grandes perdas na sobrevivência destes insetos. Fatores de adversidade, como a alteração climática, o comprometimento na genética, a implementação de monoculturas no campo, os patógenos e os inseticidas são os protagonistas na contribuição para o desaparecimento das abelhas (Samson-Robert et al., 2015).

2.4. Melhoramento genético em abelhas

O melhoramento de abelhas é de grande importância para o setor apícola. Envolve fatores como o manejo de colmeias, trocas de rainhas e a inseminação instrumental, sendo um conjunto de atividades fundamentais para o cotidiano apícola. O Brasil é um país que apresenta boas condições para o desenvolvimento deste ramo de atividade, colaborando com clima e áreas para produção, assim como uma vasta flora que supre as necessidades alimentares e nutricionais das abelhas (Campos, 2008).

É de grande importância realizar o melhoramento genético em massa, ou seja, com um grande número de colmeias, para que assim possam ser observadas características específicas de cada colmeia e realizada a seleção, utilizando alguns critérios ou características, como produção de mel, produção de própolis, infestação por varroa, comportamento higiênico, entre outros (Campos, 2008).

O método de produção de rainhas é de grande importância para a expansão da atividade apícola, pois uma rainha revigorada e forte, com características selecionadas, faz com que a produção aumente e que a indústria apícola esteja sempre evoluindo tecnologicamente (Winston, 2003; Campos, 2008).

A seleção de abelhas rainhas para o melhoramento genético é a ferramenta por meio da qual podem ser propagadas características fenotípicas observadas, provenientes das características genotípicas do animal, buscando desenvolvê-las de forma a atender a expectativa de desenvolvimento de uma colmeia com qualidade.

Idade e qualidade de uma abelha rainha são fatores fundamentais para o desenvolvimento de uma colônia. Rainhas mais novas e que foram selecionadas apresentam mais vigor, em termos reprodutivos, em relação às rainhas mais velhas e que não passaram por um processo de seleção. Por isso, poderão estimular enxameação e redução populacional, levando consigo metade do enxame (Wilkinson e Brown, 2002).

A quantidade de inseticidas utilizados nas lavouras assusta, principalmente a utilização dos inseticidas sistêmicos, aplicados no solo e nas plantas que irão fornecer pólen e néctar para as abelhas, mas que, com resíduos em doses subletais, não podem ser detectados, mas podem afetar o sistema de orientação de abelhas ou sistema de imunidade genética (Chauzat et al., 2006).

A presença de uma rainha com boa seleção genética garante a qualidade da linhagem das colônias e essas qualidades são transmitidas ao longo das gerações, contribuindo para a qualidade, seja com relação à produção, seja quanto à tolerância a pragas e a doenças (Wilkinson e Brown, 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das abelhas

A coleta dos enxames de *Apis mellifera* foi realizada no município de Maringá, com as localizações geográficas de latitude sul $23^{\circ} 24' 34,8778''$ e longitude oeste $51^{\circ} 56' 18,3272''$, e em cidades vizinhas. As coletas, sempre em ninhos naturais, foram feitas tanto na zona urbana quanto na zona rural, nos meses de fevereiro, março e abril de 2015, em parceria com o corpo de bombeiros e prefeitura municipal.

Foram coletados 5 enxames para o experimento. As abelhas foram acondicionadas em núcleos, os quais serviram de ninho ao longo do experimento. Esses ninhos foram mantidos no apiário da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá, (Figura 1).



Figura 1 - Material para coleta das abelhas. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2. Produção de rainhas filhas

A técnica de divisão de enxame foi empregada para a produção das rainhas filhas das rainhas parentais. Dessa maneira, foi colocado um núcleo sobre o outro

para a expansão da colmeia. Após o desenvolvimento do enxame, realizava-se a separação dos núcleos que se mantinham com a quantidade de 5 caixilhos cada, caracterizando a formação da geração seguinte, sendo que o núcleo já existente permanecia com a rainha velha e o núcleo novo (geração seguinte) permanecia com os favos de crias abertos para a estimulação e formação da nova rainha.

O núcleo antigo era removido para outra localização, com a mesma rainha dando continuidade ao seu trabalho e o novo núcleo ocupando a localização do antigo, com a presença de abelhas campeiras, a formação das realeiras e o nascimento da nova rainha.

3.3. Montagem dos bioensaios

A concentração de tiametoxam empregada nos bioensaios foi de 1%. Cada bioensaio consistiu de um controle e três repetições. Os bioensaios foram realizados por contato, utilizando a inserção de papel filtro embebido em 5 mL de inseticida tiametoxam no interior do núcleo. No experimento controle, foi inserido o papel de filtro embebido com 5 mL de acetonitrila (solvente do tiametoxam) (Figura 2).



Figura 2 - Papel filtro com tiametoxam 1% inserido no núcleo.
Fonte: Arquivo pessoal.

A troca do papel filtro controle e tratado foi realizada a cada 15 dias durante todo o período do experimento, seguindo a orientação da aplicação conforme a bula do fabricante. Após o tempo de 45 dias, considerando o ciclo de uma geração, iniciou-se a produção das abelhas rainhas filhas, posteriormente, acasaladas naturalmente e introduzidas em um novo núcleo para a próxima geração.

Esse processo foi realizado por quatro gerações, visando a verificar a ocorrência de tolerância ao inseticida neonicotinoide tiametoxam. Os núcleos foram marcados/identificados como núcleo CONTROLE, núcleo A, núcleo B e núcleo C, para os parentais seguindo a mesma marcação para as gerações descendentes, respectivamente (Figura 3).

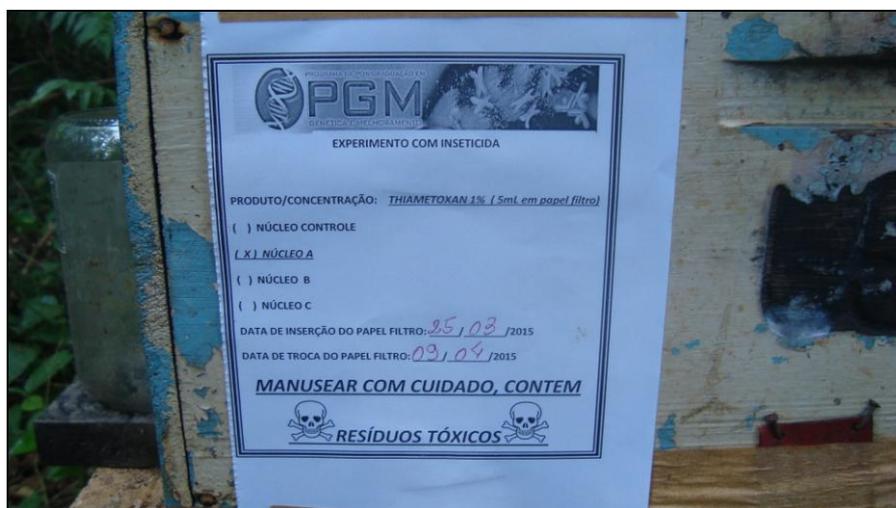


Figura3 - Identificação do núcleo.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.4. Diluição e aplicação do neonicotinoide tiametoxam

O princípio ativo do tiametoxam foi preparado de acordo com as orientações do fabricante para aplicação em soja. A partir dessa solução principal, foi realizada a diluição para 1%, que corresponde a 1,65 g i.a./L.

3.5. Análise em campo

Durante todo o período de execução do experimento, iniciado em março de 2015, foram realizadas observações sobre o comportamento das operárias dentro dos ninhos. Foi observado: atividade das operárias (cuidando da cria, em constante

movimento ou paradas); estimativa do número de abelhas; se houve produção de machos; abandono da colmeia; se operárias estavam ou não se alimentando; condição do papel de filtro embebido no inseticida (operárias estavam retirando ou não da colmeia).

3.6. Teste de toxicidade

As abelhas foram coletadas de forma aleatória dentro de cada núcleo dos bioensaios. Esses núcleos foram identificados como núcleo controle F3, núcleo F3 A, núcleo F4 B e núcleo F3 C na FEI/UEM e transportadas até o laboratório na Universidade Estadual de Maringá, para os testes.

Para a realização dos testes de exposição por via de contato, foram utilizados os ingredientes ativos comerciais, sendo que as concentrações a serem utilizadas foram determinadas por meio do bioensaio localizado na fazenda Experimental de Iguatemi, utilizando a concentração de 50% de tiametoxam.

Potes de vidro foram utilizados para acondicionar cada bioensaio no laboratório. Os papéis filtros, cortados de forma a ocupar o fundo dos potes, foram embebidos com 1 mL acetonitrila, para o controle, e com 1 mL da solução de tiametoxam na concentração de 50%, para os núcleos F3A, F4B e F3C. Esses papéis foram acondicionados no fundo dos potes após secagem na capela de exaustão.

Para uma observação de 24 horas, foram realizadas três repetições para cada núcleo tratado com neonicotinoide tiametoxan do bioensaio e o núcleo controle tratado com acetonitrila. Cada repetição para o teste de observação era composta por um frasco contendo 20 abelhas, tanto para os bioensaios tratados com o inseticida como para o controle.

As abelhas foram anestesiadas em congelador e posteriormente colocadas em frascos de vidro contendo papel filtro com o inseticida, uma quantidade de alimento preparado com mel, açúcar e um algodão com água. A entrada dos frascos foram fechados com tecido voil preso com fita de borracha.

Os potes de vidro com os núcleos F3 A, F4 B e F3 C foram mantidos em câmara climatizada, por 24 horas, em temperatura de 33 °C e umidade relativa \pm 80%. O controle foi mantido nas mesmas condições mas em local separado.

Após o período de realização dos testes, foram contadas as abelhas mortas, observadas as condições de movimento e de vôo das abelhas sobreviventes.

3.7. Concentração crítica de eletrólitos (CEC)

A inserção do papel filtro dentro dos núcleos ao longo das gerações permitiu uma simulação de contato com o inseticida neonicotinoide tiametoxam, como se as abelhas tivessem contato com o mesmo nas plantações e lavouras, considerando a avaliação de comportamento e o desenvolvimento dos insetos.

Para a realização da análise citoquímica, foram coletadas amostras das abelhas mantidas nos bioensaios da Fazenda Experimental de Iguatemi, que estavam em contato com o neonicotinoide tiametoxam na concentração de 1%.

Para análise da estrutura da cromatina, por meio da técnica de Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC), foram extraídas glândulas hipofaríngea e cérebro de abelhas *A. mellifera* contaminadas com doses subletais de tiametoxam.

Com a utilização de uma lupa, realizou-se a extração da glândula hipofaríngea e do cérebro da abelha. O material foi depositado sobre uma lâmina de vidro com uma gota de ácido acético e sob o material foi colocada uma lamínula, esmagando-a. A lâmina foi submetida ao nitrogênio líquido e, em seguida, retirada a lamínula e mergulhada em uma solução fixadora de etanol: ácido acético (3:1 v/v), por 2 minutos. Após esse período, a lâmina foi lavada em etanol 70% por 5 minutos.

Realizados estes procedimentos, as lâminas foram coradas com o corante azul de toluidina em cubas próprias para este procedimento. Posteriormente, nove colorações foram realizadas. As concentrações do corante de Azul de Toluídina utilizadas foram: 0,02%, 0,05%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, 0,15%, 0,20%, 0,30% e o controle. As lâminas ficaram em contato com o corante por 20 minutos e, em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas no porta lâminas para secagem em temperatura ambiente. Finalizada a secagem, as lâminas foram mergulhadas em cubetas contendo Xylol, por 15 minutos, montadas com entellan e lamínula, e analisadas em microscópio óptico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento após contaminação crônica com tiametoxam

O comportamento de limpeza das abelhas foi observado com a presença do papel filtro, uma vez era feita a remoção total ou parcial, garantindo assim o contato com a superfície e o inseticida. No início dos tratamentos, contaminando os núcleos com tiametoxam, as abelhas apresentaram dificuldades na locomoção (andar e voar), tremores e espasmos, além de alterações nas características de comportamento quanto ao armazenamento do pólen, mel e própolis de forma reduzida ou não armazenando (Figuras 4, 5, 6, 9 e 10). Essas alterações eram visíveis durante a manutenção dos núcleos, mas, após a emergência de novas operárias e zangões, o comportamento e atividades foram retomados e a condição populacional do núcleo equilibrada. A alimentação fornecida era sempre consumida.

O comportamento higiênico caracterizado pelo serviço interno das operárias envolve o ato de limpar a colmeia, desopercular as células dos favos e remover crias mortas ou contaminadas dentre outros conteúdos presentes no favo ou na colméia. Isso garante a dinâmica populacional da espécie o que lhe confere uma barreira para impedir o desenvolvimento de doenças ou parasitas (Arathi et al., 2000).



Figura 4 - Inserção de papel filtro.
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 5 - Remoção do papel filtro pelas abelhas.
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 6 - Abelhas operárias mortas no fundo do núcleo.
Fonte: Arquivo pessoal.

Embora a localização do apiário apresentasse condições favoráveis ao bom desenvolvimento dos enxames, após 09 meses do tratamento crônico com tiametoxam 1%, duas colônias parentais que se apresentavam em boas condições abandonaram os núcleos (Figuras 7 e 8).



Figura 7 - Abandono de núcleo.
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 8 - Abandono de núcleo.
Fonte: Arquivo pessoal.

A coleta de néctar sempre ocorreu de forma que os núcleos sempre estavam com estoque de alimento para o enxame. O núcleo é composto por cinco caixilhos de madeira, onde estão inseridos os favos. O caixilho central é o local onde a abelha rainha faz a postura dos ovos e os caixilhos laterais são os locais onde as abelhas depositam o mel nos favos. As abelhas de alguns núcleos apresentaram uma característica importante no comportamento: depositam mel ao centro do núcleo mesmo com a presença da rainha e a realização da postura de ovos (Figuras 9 e 10).



Figura 9 - Armazenamento de mel, pólen e crias em desenvolvimento. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 10 - Crias em desenvolvimento. Fonte: Arquivo pessoal.

A. mellifera é um inseto altamente social, o que colabora para sua grande adaptabilidade ao meio, conferindo-lhe características próprias, como o cuidado conjunto de sua cria, possibilitando a sobreposição de gerações e garantindo o sustento de todos por um período de tempo, mesmo sendo estas proles expressivas, variando em média de 50.000 a 80.000 indivíduos. As abelhas dependem de captar recursos e garantir a sobrevivência do enxame e, assim, o trabalho em conjunto se faz necessário de forma ordenada e eficiente, beneficiando a garantindo da

sobrevivência momentânea e futura da colônia (Michener, 1974; McFarland, 1993; Bianchini, 1998).

Os neonicotinoides são empregados para o controle de insetos-pragas nas lavouras, mas seus resíduos presentes em néctar ou culturas tratadas podem afetar de forma direta as abelhas, comprometendo sua fisiologia e habilidades cognitivas, incluindo o forrageamento, o comportamento e a memória, com perturbação sináptica, causando bloqueio e não localização do ninho (Fischer J et al., 2014; Sandrock et al., 2014), como observado no tratamento crônico com tiametoxam 1%.

4.2. Produção de rainhas tolerantes ao tiametoxam

As gerações das abelhas foram produzidas ao longo do ano de 2015, período que apresentou um inverno atípico e dificuldades climáticas, como o grande volume de chuva em períodos longos. As rainhas filhas eram produzidas a cada 45 dias após o início do novo enxame. A geração F1 iniciou em abril /2015; a F2 em agosto/2015, F3 em outubro/2015 e a F4 em dezembro/2015.

A técnica de divisão de enxame foi empregada para a produção das rainhas filhas, formando assim as gerações F1, F2, F3 e F4. A garantia de uma boa postura foi o ponto de partida para a separação dos núcleos e a formação das novas colméias. Houve grande produção de realeiras para a formação das novas rainhas, o que garantiu o desenvolvimento dos núcleos (Figura 11).



Figura 11 - Formação de realeiras nos núcleos. Fonte: Arquivo pessoal.

A multiplicação artificial de colônias é uma técnica apresentada na apicultura para a conservação e manutenção do material genético, multiplicando, assim, as

qualidades existentes num determinado grupo de indivíduos. Possibilita, ainda, a qualidade da linhagem das colônias, aproveitando o potencial e selecionando características específicas, seja para produção ou defesa e tolerância a pragas e doenças (Campos, 2008; Martinez et al., 2012).

As abelhas ao longo das gerações apresentaram uma contínua atividade de comportamento higiênico na limpeza dos núcleos, mantendo o contato com o papel filtro que continha o tiametoxam 1%. Nas gerações observadas, as abelhas sempre mantiveram suas atividades de coleta, armazenamento, produção de mel, produção de favos, alimentação da rainha e seguiram o ciclo de expulsar os zangões da colméia no período de inverno.

Não foi perceptível, nas gerações seguintes, nenhum comprometimento na mobilidade, localização e vôo, o que garantiu boa visualização na parte defensiva da colméia. As abelhas rainhas produzidas realizaram postura normal, embora tenha havido mudança de comportamento no início da geração em F1, núcleos A e B, com armazenamento de mel nos favos centrais, o que foi modificado ao longo do tempo com o trabalho da rainha desenvolvida neste núcleo.

O inseticida neonicotinoide tiametoxam mostrou-se inicialmente muito tóxico, comprometendo a fisiologia e o comportamento das abelhas, mesmo em pequenas concentrações, corroborando a sugestão de muitos pesquisadores de que os inseticidas estão comprometendo o desenvolvimento das abelhas, contribuindo para o seu desaparecimento dos campos de cultivos de muitos ecossistemas, expressando a desordem e o colapso das colônias. O uso do inseticida tem sido uma das principais causas desse distúrbio multifatorial.

A obtenção de rainhas tolerantes a inseticidas é uma colaboração para apicultura, pois selecionar rainhas com esta característica, associada a outras, como a resistência a pragas ou parasitas, garante ao produtor uma colméia mais eficiente, tanto para a resistência aos fatores que ameaçam a sobrevivência da abelha, quanto para uma produção de qualidade e com quantidade.

A característica da tolerância ao inseticida pode garantir ao apicultor a proteção da colméia no momento em que a abelha busca néctar e pólen em plantas que apresentam resíduos de inseticidas em doses subletais. Assim, ela retornará ao ninho para indicar o local para a coleta de alimento, impedindo que se estimule C.C.D.

Uma rainha jovem é sinal de produção e de qualidade, o que, associado à seleção de tolerância tanto a inseticidas quanto a doenças, pode melhorar a produção de mel, pólen e cera, reduzindo também a utilização de outros produtos de proteção para as colméias.

4.3. Testes para validar a geração F4 de rainhas tolerantes ao tiametoxam

4.3.1. Toxicidade do tiametoxam na F4

A contaminação aguda das operárias das gerações F3 e F4, em laboratório, mostrou baixa mortalidade. Para cada teste, houve variação entre 1 a 3 abelhas mortas, com a quantidade de 20 abelhas por frasco.

O teste de toxicidade em papel filtro foi feito por 24 horas, no período de três dias, em B.O.D., com tiametoxam 50% nas gerações F₃ do núcleo A, F₄ do núcleo B e F₃ do núcleo C. No teste com a geração F₃, as operárias controle foram submetidos à acetoneitrila fora da B.O.D., por três dias. Para cada dia de teste de toxicidade foram coletadas 20 novas abelhas (Quadro 1).

Quadro 1 - Teste de toxicidade por contato

Gerações / dias	1º dia	2º dia	3º dia
Controle F3	19	20	20
Geração F3 A	18	17	17
Geração F4 B	17	19	17
Geração F3 C	17	18	18

Os neonicotinoides são tóxicos, competindo com acetilcolina e com sintomas que podem causar danos prejudiciais ao sistema nervoso central, levando o inseto à morte, tremores, dificuldade em locomoção e excitabilidade (Tomizawa e Casida, 2005).

Durante os bioensaios, as abelhas maceraram o papel filtro que ficava no fundo do pote de vidro que continha a solução de tiametoxam, mostrando o mesmo comportamento observado em campo, no tocante ao consumo de alimento e de água e ao agrupamento para manter a temperatura.

Vários são os trabalhos que buscam compreender os danos causados pelos inseticidas, pois são de grande e fundamental importância para desvendar a ação destes produtos sobre a vida dos insetos, pois agem de forma direta e sistêmica, dificultando o desempenho comportamental e vital da abelha (Blaquière et al., 2012).

Até o término deste trabalho, As rainhas selecionadas da geração F4 apresentaram tolerância ao tiametoxam, mas ainda não é possível considerá-las resistentes. Para isso, será necessário aumentar o número de gerações de rainhas tolerantes até chegar a uma linhagem que realmente seja resistente a esse neonicotinóides.

4.3.2. Concentração crítica de eletrólitos

DNA não complexado à proteína e complexos DNA-proteína em cromatina de células somáticas, geralmente, exibem basofilia metacromática na cor violeta, quando corados com soluções de azul de toluidina em um pH 3,6 - 4,0 (Mello, 1997).

Com o azul de toluidina na presença de íons Mg^{2+} ocorre uma disputa pelo ponto de ligação ou cargas negativas do DNA ou RNA e a metacromasia desaparece em função de determinada concentração do íon Mg^{2+} (Mello, 1997).

A cromatina condensada expressa um elevado valor de CEC, enquanto a cromatina relaxada exibe menor valor de CEC, logo, alterações na estrutura da cromatina geram reflexos na atividade gênica (Falco, 1999; Mello, 1997).

Após obter núcleo com rainha de 4ª geração submetida à timetoxam 1%, foram realizados testes de Concentração Crítica de Eletrólitos para detectar possíveis alterações na expressão gênica das abelhas tolerantes.

A análise citoquímica mostrou que o ponto de CEC em lâminas de cérebro controle ocorreu na concentração de 0,30%, enquanto a geração F3 do núcleo A ocorreu na concentração de 0,15%, indicando um aumento de concentração. Portanto, provavelmente, tenha ocorrido condensação da cromatina e consequente redução na expressão gênica (Quadro 1). Nas lâminas de glândula hipofaríngeas das operárias do núcleo controle não foi possível determinar o ponto de CEC nas concentrações analisadas, mas, nas gerações F4 do núcleo B e F3 do núcleo C, os pontos de CEC foram de 0,20% e 0,30%, evidenciando novamente que houve

condensação da cromatina e conseqüente diminuição da expressão gênica (Quadro 2).

Os resultados de CEC são iniciais, mas permitem uma análise parcial do resultado da contaminação crônica no tratamento com tiametoxam 1% ao longo de quatro gerações de rainhas de *A. mellifera*. Tanto no cérebro quanto nas glândulas hipofaringeanas, houve uma diminuição da expressão gênica, o que provavelmente altera a fisiologia tanto comportamental quanto com relação ao desenvolvimento das operárias. O cérebro está relacionado à capacidade de mobilidade (vôo), localização e coleta de néctar e pólen, enquanto as glândulas hipofaringeanas possuem papel importante na alimentação da cria, uma vez são responsáveis pela produção de geléia real.

A determinação da concentração crítica de eletrólitos contribui muito para a identificação de alterações na cromatina dos insetos. Melo e Falco (1996) pesquisaram a concentração crítica de eletrólitos nos núcleos de espermatozoides e glândulas de espermateca de abelhas rainhas, com o objetivo de detectar diferenças nas concentrações para a cromatina destas células. O valor da concentração crítica de eletrólitos foi o mesmo para as diferentes células somáticas em análise. Verificou-se aumento do valor nos espermatozoides, onde se constata uma maior disponibilidade de grupos fosfatos de DNA do que em células somáticas, sendo conferida a diferença de complexos de proteínas (Melo e Falco, 1996).

O aumento de C.E.C. nos espermatozoides no interior da espermateca se dá devido a alterações adicionais após o espermatozoide penetrar o trato da fêmea, afetando o complexo de proteínas do DNA.

Falco e Mello (1999) verificaram o espermatozoide de espécies conhecidas e de espécies suspeitas como as de abelhas, ouriço – do – mar, zangão e rã, de apresentarem variantes de histona H1 a partir da afinidade com os seus complexos de proteínas com o Azul de Toluidina na presença de Mg^{2+} . A C.E.C. para abelhas não expressou relação filogenética particular, relação do material do ouriço do mar com histonas de cromatina de eritrócitos de galinhas. A C.E.C. de histonas de cromatina de células de esperma onde há presença de H1 indicou uma grande variabilidade nos complexos de DNA-proteína com pouco valor na filogenética.

O tratamento com azul de toluidina a 0,025%, em Tampão Mac Ilvaine pH 4,0, acrescido de $MgCl_2$ em diferentes concentrações, produziu importantes

respostas de Basofilia nuclear das glândulas hipofaríngeas e do cérebro de *Apis mellifera*, conforme pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2 - Respostas de Basofilia nuclear de glândulas hipofaríngeas e de cérebro de *Apis mellifera*

	CONTROLE		F 3 A		F4 B		F3 C	
	Cérebro	GH	Cérebro	GH	Cérebro	GH	Cérebro	GH
AT sem MgCl ₂	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl ₂ 0,02M	Vi	Vi	Vi	Vi/Az	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl ₂ 0,05 M	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi	Vi	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl ₂ 0,08 M	Vi/Az	Vi/Az	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl ₂ 0,10 M	Vi	Vi	Vi	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi
AT + MgCl ₂ 0,12 M	Az/Ve	Az/Ve	Vi/Az	Az/Ve	Vi/Az	Az/Ve	Vi/Az	Az/Ve
AT + MgCl ₂ 0,15 M	Vi/Az	Vi/Az	Ve	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl ₂ 0,20 M	Vi	Vi	Ve	Az/Ve	Vi/Az	Ve	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl ₂ 0,30 M	Ve	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Ve	Az/Ve	Ve
Valor de CEC	0,30	-----	0,15	-----	-----	0,20	-----	0,30

Legenda: Vi: violeta, Az: azul, Ve: verde.

O desenvolvimento agrícola apresenta um grande investimento, tanto nos níveis de produção quanto em áreas cultiváveis, o que pode gerar grandes conseqüências negativas, no momento em que as áreas ampliadas afetam os habitats de polinizadores, causando destruição nestas populações. As abelhas são insetos afetados de grande forma com a utilização de inseticidas, comprometendo seu trabalho e desenvolvimento no campo. Contudo, existem vários métodos físicos, químicos e biológicos que podem contribuir para a identificação de resíduos de inseticidas que afetam o equilíbrio ambiental das abelhas. (Falco et. al, 2010).

A representação ecológica das abelhas é de grande importância. As abelhas afetadas pelos inseticidas provocam mudanças no meio onde vivem, pois estes insetos representam um grupo bioindicador e respondem às alterações ambientais proporcionadas pelo ser humano.

O alto índice de mortalidade de abelhas no mundo tem causado grandes preocupações. Pesquisas têm evidenciado que o uso indiscriminado de inseticidas, o desmatamento e a poluição são os principais fatores causadores dessas mortes. Essas mortes, em tempos não muito remotos, serão responsáveis por grande desequilíbrio ecológico e grandes perdas na produção de produtos importantes para os humanos (Fermino et. al, 2011).

5. CONCLUSÕES

a) O tratamento crônico com tiametoxam 1% causou inicialmente alterações comportamentais nas operárias.

b) Após um período de 25 dias em tratamento crônico com tiametoxam 1%, os núcleos voltaram às suas atividades normais.

c) Os testes de toxicologia e CEC mostraram que as rainhas selecionadas e mantidas em tratamento crônico com tiametoxam 1% estão se tornando tolerantes a esse neonicotinoide.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf. Acesso em: 15, dezembro, 2015.
- ARATHI, H.S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee, *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*): behavioural repertoire of hygienic bees. **Journal of Ethology**, 106:365-379, 2000.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, 55:149-152, 1998.
- BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science Pollution Research**, 8:5603-14, 2013.
- BRAND, D.D. The honeybee in New Spain and Mexico. **Journal of Cultural Geography**, 9:71-81, 1988.
- CAMPOS, J.C.P. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2008. 617p.
- CASTAGNINO, G.L.; MIGUELANGELO, Z.A.; LENGLER, S.; GARCIA, G.G.; MENEZES, L.F.G. Desenvolvimento de núcleos de *Apis mellifera* alimentados com suplemento aminoácido vitamínico, Promotor L. **Ciência Rural**, 36:685-688, 2006.
- CHAUZAT, M.P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, 99: 253-262, 2006.
- COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191p.

COX-FOSTER, D.; VANENGELSDORP, D. **Solving the mystery of the disappearing bees**. Disponível em: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=saving-the-honeybee>. Acesso em: 10, novembro, 2015.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: DADE, H.A. **Anatomy and dissection of the honeybee**. Oxford: International Bee Research Association, 1994. 158p.

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

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LEMENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 48:242-250, 2005.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 20:180-186, 2004.

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

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, 418:700-707, 2002.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELER, T.W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Sci.* **Pubmed**, 64:1099–1105, 2008.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 33:719-731, 2014.

FALCO, J.R.P.; HASHIMOTO, J.H.; FERMINO, F.; TOLEDO, V.A.A. Toxicity of Thiamethoxam, Behavioral Effects and Alterations in Chromatin of *Apis mellifera* L.,

1758 (Hymenoptera; Apidae). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 6:823-828, 2010.

FALCO, J.R.P.; MELLO, M.L.S.; MARIA, S.S.; GRAZZIOTIN, N.A. Critical electrolyte concentration of chicken erythrocyte chromatin. **Acta Histochem**, 32:73-76, 1999.

FALCO, J.R.P.; MELLO, M.L.S. Concentração crítica de eletrólitos da cromatina dos espermatozoides contendo variantes histona H1. **Genetics and Molecular Biology**, 22:197-200, 1999.

FERMINO, F.; FALCO, J.R.P.; TOLEDO, V.A.A.; TAKASUSUKI, M.C.C.R. Isoenzymes and Cytochemical Analysis in *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* After Herbicide Contamination. **Sociobiology**, 2:353-366, 2011.

FISCHER, J.; MULLER, T.; SPATZ, A-K.; GREGGERS, U.; GRUNEWALD, B.; MENZEL, R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLOS ONE**, 9:1-10, 2014.

FORD, K.A.; CASIDA, J.E. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 56:10168-10175, 2008.

FREE, J.B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1993, 684p.

GONÇALVES, L.S. The introduction of the African Bees (*Apis mellifera scutellata*) into Brazil and some comments on their spread in South America. **American Bee Journal**, 114:414-419, 1974.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. 2003. p. 173-200.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, 32:996-1012, 2009.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498:61-77, 2001.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, 39:3-5, 1967.

KNUTSON, R.D. Economic impacts of reduced pesticide use in the United States: measurement of costs and benefits. **Agricultural and Food Policy Center**, 7:21, 1999.

KOSTARELOU-DAMIANIDOU, M.; THRASYVOULOU, A.; TSELIOS, D.; BLADENOPOULOS, K. Brood and honey production of honeybee colonies requeened at various frequencies. **Journal Apicultural Research**, 34:9-14, 1995.

MACIEIRA, O.J.D.; HEBLING-BERALDO, M.J.A. Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* (F., 1793) (Hymenoptera – Apidae). **Journal of Apicultural Research**, 28:3-6, 1989.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, A.; WIDMER, H. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, 57:906-913, 2001.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.D.; MORETI, A.C.D.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, 36:949-953, 2006.

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 13:982-990, 2012.

MATSUDA, K. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, 22:573-580, 2001.

MCFARLAND, D. The complex behaviour of honeybees. In: LONGMAN, A.W. **Animal behaviour: psychobiology, ethology and evolution**. Oxford: University of Oxford Press, 1993. p. 441-461.

MELLO, M.L.S.M.; FALCO, J.R.P. Complexes in Spermatozoal and Somatic Cell Nuclei of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Genetis and Molecular Biology*, 26:793-795, 1996.

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

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

MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal Genetics**, 20:257-264, 1997.

MEYER, C.R.; WIESE, H. Breves noções de morfologia e anatomia da abelhas. In: WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre: Agropecuária, 1985. p. 51-70.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge, Massachusetts: The belknap press of harvard university press, 1974. 404p.

MONCHARMONT, F.; DECOURTYE, A.; HENNEQUET-HANTIER, C.; PONS, O.; PHAM-DELEGUE, M. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22:3088–3094, 2003.

MORAKCHI, S.; MAÏZA, A.; FARINE, P.; SOLTANI, N. Effects of a neonicotinoid insecticide (acetamiprid) on acetylcholinesterase activity and cuticular hydrocarbons profil in German cockroaches. **Communications Agricultural and Applied Biological Sciences**, 70:843–848, 2005.

MOTOHIRO, T.; JOHN, E.C. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 45:247-268, 2005.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; ELBERT, A.; JESCHKE, P.; TIETJEN, K. Acetylcholine receptors as site developing neonicotinoid insecticides. In: ISHAAYA, I. **Biochemical sites in insecticide action and resistance**. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 77-105.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SALGADO, V.L.; KAUSSMANN, M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 76:55-69, 2003.

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

OLDROYD, B.P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, 5:1195-1199, 2007.

PARKER, R. Ecological Adaptation of diverse Honey Bee (*Apis mellifera*) populations. **Plos One**, 5:1-12, 2010.

PEREIRA, F.M. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1-7, 2006.

PETTIS, J.S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, 8:1-9, 2013.

PINHEIRO, J.N.; FREITAS, B.M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Ecologia Australis**, 14:266-281, 2010.

PINHO, F.; RUBENS. **Apicultura: criação de abelhas**. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 85p.

RAND, E.E.D.; SMIT, S.; BEUKES, M.; APOSTLIDES, Z.; PIRK, C.W.W.; NICOLSON, S.W. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. **Nature**, 5:1-11, 2015.

RIGITANO, R.L.O.; CARVALHO, G.A. **Toxicidade e seletividade de inseticidas**. Lavras: UFLA/FAEP, 2001. 72p.

RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Journal of Apidologie**, 9:363-381, 1978.

SAMSON-ROBERT, O.; LABRIE, G.; CHAGNON, M.; FOURNIER, V. Neonicotinoid-Contaminated Puddles of Water Represent a Risk of Intoxication for Honey Bees. **Plos One**, 9:1-17, 2014.

SAMSON-ROBERT, O.; LABRIE, G.; MERCIER, P.L.; CHAGNON, M.; DEROME, N.; FOURNIER, V. Increased Acetylcholinesterase Expression in Bumble Bees During Neonicotinoid-Coated Corn Sowing. **Journal Nature**, 5:1-8, 2015.

SANDROCK, C.; TANADINI, M.; TANADINI, L.G.; FAUSER-MISLIN, A.; POTTS, S.G. Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. **Plos One**, 9:1-13, 2014.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. Nova Iorque, 1956. 334p.

STORER, T.I.; USINGER, R.I.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. Classe Insecta: Insetos. In: STORER, T.I.; USINGER, R.I.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. (eds.). **Zoologia Geral**. São Paulo: Editora Nacional. 1998. p. 504-545p.

THOMPSON, H.M. Behavioural effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, 12:1-4, 317-330, 2003.

TOMIZAWA, M. Chemical biology of the nicotinic insecticide receptor. **Advances in Insect Physiology**, 44:63–99, 2013.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. **Pest Management Science**, 57:914–922, 2001.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 45:247-268, 2005.

WIESNER, P.; KAYSER, H. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Hoboken, 14:221-230, 2000.

WILKINSON, D.; BROWN, M.A. Rearing Queens Honey Bees in a QueenRight Colony. Apicultural Research, **American Bee Journal**. 20:270-274, 2002.

WILLIAMSON, S.M.; WRIGHT, G.A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **The Journal of Experimental Biology**, 216:1799-1807, 2013.

WINSTON, M.L. **The biology of the honeybee**. Cambridge: Harvard University Press, 1987. 281p.