



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE**



**TOXICIDADE E ANÁLISE MOLECULAR DE PESTICIDAS EM ABELHAS
AFRICANIZADAS, *Apis mellifera* L.**

LAINA PIRES ROSA

Gurupi – TO
Outubro/2024

LAINA PIRES ROSA

**TOXICIDADE E ANÁLISE MOLECULAR DE PESTICIDAS EM ABELHAS
AFRICANIZADAS, *Apis mellifera* L**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Renato de Almeida Sarmiento

Coorientadores: Prof Dr Carlos A. S. Gravato e Prof Dr. Paulo Henrique Tschoeke

Gurupi – TO
Outubro/2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

P667t Pires Rosa, Laina.

Toxicidade e análise molecular de pesticidas em abelhas africanizadas,
Apis mellifera L. / Laina Pires Rosa. – Palmas, TO, 2024.

95 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Biodiversidade e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Renato Almeida Sarmiento

1. Ecotoxicologia. 2. Biodiversidade. 3. Adaptações. 4. Abelhas. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

LAINA PIRES ROSA

**TOXICIDADE E ANÁLISE MOLECULAR DE PESTICIDAS EM ABELHAS
AFRICANIZADAS, *Apis mellifera* L**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 03/10/2024

Documento assinado digitalmente
 **RENATO DE ALMEIDA SARMENTO**
Data: 03/10/2024 16:40:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento (Orientador)
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **GIL RODRIGUES DOS SANTOS**
Data: 03/10/2024 21:09:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Gil Rodrigues
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **MARCELA CRISTINA AGUSTINI CARNEIRO DA SILVA**
Data: 03/10/2024 17:41:08-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr^a. Marcela Cristina A. C. Silveira Tschoeke
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **ALTHIERIS DE SOUZA SARAIVA**
Data: 03/10/2024 17:34:35-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Althiéris de Souza Saraiva
Instituto Federal Goiano (IFGO)

Documento assinado digitalmente
 **POLIANA SILVESTRE PEREIRA**
Data: 03/10/2024 17:54:25-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pós Doutoranda Poliana Silvestre
Universidade Federal do Tocantins

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por toda coragem e força a mim concedida nos momentos difíceis desse trajeto.

À minha mãe Maria Emilia Gonçalves Pires e a minha irmã Ilana Pires Rosa. Agradeço pelo amor, apoio, dedicação, por toda ajuda oferecida emocionalmente, por acreditar e torcer a cada dia, mês e ano que se passa, além de partilhar momentos de alegria e tristeza me dando força a cada passo.

Aos professores doutores Renato A. Sarmento, Carlos A. S. Gravato, Paulo Henrique Tschoeke e Marcela C. A. C. S. Tschoeke, por todo apoio e orientação, pelos seus ensinamentos, incentivos sempre se empenhando cada vez mais para transmitir da melhor forma o conhecimento científico e me proporcionando mais esta conquista importante em minha carreira profissional.

Ao grupo de pesquisa Bee's pelo apoio durante a condução de todos os experimentos realizados durante a execução desse projeto, que ao fim se tornamos amigos.

Aos meus eternos amigos Elisiane do Socorro, Raffael Lima da Silva, Tania Sakai, que me acompanham desde a graduação, e aos novos que surgiram nesta caminhada Sabrina Martins, Rayssa Silva e a todos os outros não mencionados que de perto e de longe, a quem tenho carinho, amor e admiração e estiveram ao meu lado ouvindo minhas lamentações e me aconselhando sempre, e pelos inúmeros e imensuráveis momentos de alegria, união e descontração e principalmente pela amizade.

À Universidade Federal do Tocantins, pela estrutura fornecida para concluir mais este trabalho.

Ao CNPq pois este trabalho foi realizado com a ajuda financeira desta instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

RESUMO

O glifosato e o fipronil são pesticidas amplamente utilizados em ambientes agrícolas, e seus efeitos sobre as abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. foram o foco deste estudo, que avaliou a sobrevivência, comportamento alimentar, peso corporal e biomarcadores moleculares das abelhas expostas a esses compostos. A pesquisa foi realizada em três locais com diferentes níveis de pressão agrícola para compreender melhor as respostas das abelhas. Os resultados revelaram que as abelhas de locais de alto impacto agrícola são mais sensíveis aos pesticidas, apresentando maior mortalidade, menor consumo alimentar durante e após a exposição, diminuição do peso corporal e aumento da quantidade de proteínas. A exposição ao glifosato causou estresse oxidativo e realocação de recursos energéticos para desintoxicação, evidenciada pela redução na atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione S-transferase. As abelhas expostas ao fipronil mostraram alterações no metabolismo energético e comportamento alimentar, com maior sensibilidade nas áreas de alta pressão agrícola, como indicado por um menor LD₅₀ oral em 48 horas. A pesquisa destaca a importância dos biomarcadores para avaliar os efeitos dos pesticidas, oferecendo uma compreensão mais profunda dos processos de desintoxicação e dos danos oxidativos em abelhas expostas a pesticidas. Biomarcadores como a atividade da colinesterase, níveis de glutathione total e proteínas foram cruciais para detectar distúrbios fisiológicos induzidos pelos pesticidas. A capacidade das abelhas, oriundas de locais sem pressão agrícola, de evitar o fipronil durante a exposição sugere uma adaptação comportamental ausente em áreas de alta pressão agrícola. Pesquisas futuras devem utilizar ferramentas moleculares e bioquímicas para explorar os mecanismos subjacentes às respostas das abelhas à exposição ao glifosato e ao fipronil, investigando alterações na expressão gênica, atividades enzimáticas e metabolismo energético. Esse conhecimento ajudará a desenvolver estratégias para mitigar os efeitos adversos dos pesticidas nas populações de abelhas melíferas, assegurando a sustentabilidade da polinização agrícola.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Biodiversidade; Adaptação; Abelhas.

ABSTRACT

Glyphosate and fipronil are widely used pesticides in agricultural settings, and their effects on Africanized honeybees *Apis mellifera* L. were the focus of this study, which evaluated survival, feeding behavior, body weight, and molecular biomarkers of bees exposed to these compounds. The research was conducted in three locations with different levels of agricultural pressure to better understand the responses of bees. The results revealed that bees from high-impact agricultural areas are more sensitive to pesticides, presenting higher mortality, lower food consumption during and after exposure, decreased body weight and increased protein intake. Exposure to glyphosate caused oxidative stress and reallocation of energy resources to detoxification, evidenced by reduced activity of antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase. Bees exposed to fipronil showed changes in energy metabolism and feeding behavior, with greater sensitivity in areas of high agricultural pressure, as indicated by a lower oral LD₅₀ at 48 hours. The research highlights the importance of biomarkers to assess the effects of pesticides, offering a deeper understanding of detoxification processes and oxidative damage in bees exposed to pesticides. Biomarkers such as cholinesterase activity, total glutathione levels and proteins were crucial to detect physiological disturbances induced by pesticides. The ability of honeybees, originating from areas without agricultural pressure, to avoid fipronil during exposure suggests a behavioral adaptation absent in areas of high agricultural pressure. Future research should use molecular and biochemical tools to explore the mechanisms underlying honeybee responses to glyphosate and fipronil exposure, investigating changes in gene expression, enzyme activities and energy metabolism. This knowledge will help develop strategies to mitigate the adverse effects of pesticides on honeybee populations, ensuring the sustainability of agricultural pollination.

Keywords: Ecotoxicology; Biodiversity; Adaptation; Honey bees.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figure 1: Volume of syrup ($\mu\text{L}/\text{bee}$) ingested by the honey bees during the exposure period of 6 h (A), post-exposure period of 18 h (B) and the total period of 24h (C; total volume), from the populations of the reference site (blue circle), low-impacted site (orange square), and high-impacted site (black triangle) exposed to the concentrations of 0 – 14 mg a.i./bee.....27
- Figure 2: Quantity of Roundup® ingested (μg a.i./bee) by the honey bees from the populations of reference site (blue circle), low-impacted site (orange square) and high-impacted site (black triangle) exposed to the concentrations of 0 – 14 mg a.i./bee.....27
- Figure 3: Survival curve (%) of the honey bees from the reference site (blue circle), low-impacted site (orange square) and high-impacted site (black triangle) at 24 h after exposure to the concentrations of 0 – 14 mg a.i./bee.....28
- Figure 4: Total weight (g) of honey bees from the reference site (blue bar), low-impacted site (orange bar) and high-impacted site (black bar) populations exposed to control and the respective LD_{50} estimated for each population – 24 h (54.86, 59.48, and 51.76 μg a.i./bee), respectively. a equal letter do not differ significantly from each other for total weight.....29

CAPÍTULO II

- Figure 1: Sugar level (A), lipid content (B) and reserve proteins (C) of control and exposed honey bees at LD_{50} of the three populations: reference site, low impact site and high impact site.....50
- Figure 2: Energy Available (A), ETS (B) and cellular energy allocation (C) of control and exposed honeybees at LD_{50} of the three populations: reference site, low impact site and high impact site.....52
- Figure 3 – Level of total glutathione (A), glutathione S-transferase activity (B) and lipid peroxidation level (C) of control and honeybees exposed to LD_{50} of 3 populations: reference site, low-impacted site and high-impacted site.....54
- Figure 4 – Cholinesterase activity of control and honeybees exposed to LD_{50} of 3 populations: reference site, low impacted site and high impacted site. Values represent the mean ($\pm$ SEM) of 10 honeybees used for each condition.....55

CAPÍTULO III

Figure 1. Location map of the study áreas.....	69
Figure 2 Schematic representation of the honeybee acute oral exposure. A- honeybees were allowed to feed on contaminated Syrup. B – After 4h of feeding on syrup containing fipronil, all treatments were provided with plain syrup and allowed to feed for 48h, with syrup renew after 24h. C – actual images of honeybees in their experimental boxes (left hand side) and eppendorffs with the contaminated syrup (right hand side).....	72
Figure 3. Absolute percentage mortality of honeybee collected from the three-study area, after exposure to dietary fipronil.....	73
Figure 4 Volume of sucrose syrup contaminated with Fipronil ingested by honeybees from the three study areas, during the exposure period (4h).....	74
Figure 5. Volume of sucrose syrup ($\mu\text{L}/\text{bee}$) ingested by bees at 24h (A) and 48h (B) post-exposure to dietary fipronil. Bars represent the average volume consumed per bee and associated average standard error of the five replicates per treatment.....	75
Figure 6. Body weight (g) of honeybee populations from the reference site, low-impact site and high- impact site exposed to control and the respective estimated 48h - LD_{50} for each population (0.73 , 0.75 and $0.52 \mu\text{g a.i./bee}$), respectively.....	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1: Description of the study areas.....45

Table 2: Body weight and protein content of control and honeybees exposed to LD₅₀ of 3 populations: reference site, low impacted site and high impacted site.....56

CAPÍTULO III

Table I: Description of the study areas.....70

Table II: Lethal dose (LD₅₀) for honeybees from the three study sites over a period of 24 hours and 48 hours.....76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivo Geral.....	18
1.2 Objetivos Específicos.....	18
CAPÍTULO I: DOES ROUNDUP® AFFECT WORKER BEES (APIS MELLIFERA) THAT INHABIT AREAS OF HIGH AGROCHEMICAL PRESSURE?.....	19
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUCTION.....	20
2. MATERIALS AND METHODOS.....	22
2.1 Study áreas.....	22
2.2 Honey bee sampling.....	23
2.3 Honey bee handling and exposure to Roundup®.....	23
2.4 Oral lethal dose (LD ₅₀) test.....	24
2.5 Statistical analysis.....	25
3. RESULTS.....	25
4. DISCUSSION.....	29
5. CONCLUSION.....	32
REFERENCES.....	33
CAPÍTULO II: REVEALING THE SUBLETHAL EFFECTS OF GLYPHOSATE EXPOSURE ON HONEY BEE BIOMARKERS FROM LOCATIONS WITH DIFFERENT LEVELS OF AGRICULTURAL ACTIVITY.....	42
ABSTRACT.....	42
1. INTRODUCTION.....	43
2. MATERIAL AND METHODS.....	44
2.1 Studied honey bees and sites.....	44
2.2 Sample preparation.....	46
2.3 Biomarkers.....	46
2.4 Energy balance.....	47
2.5 Statistical analysis.....	48
3. RESULTS.....	48
4. DISCUSSIONS.....	56
5. CONCLUSIONS.....	59
REFERENCES.....	60

CAPÍTULO III: (ECO)TOXICOLOGICAL EFFECTS OF FIPRONIL ON HONEYBEES (APIS MELIFERA) FROM DIFFERENT AGRICULTURAL PRESSURE HABITATS.....	66
ABSTRACT.....	66
1. INTRODUCTION.....	67
2. MATERIALS AND METHODS.....	68
2.1 Honeybee collection and study areas.....	68
2.2 Chemicals.....	71
2.3 Acute oral toxicity test.....	71
2.4 Statistical analysis.....	72
3. RESULTS.....	73
4. DISCUSSION.....	77
5. CONCLUSION.....	80
REFERENCES.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	94