



EPIFÂNIO PORFIRO PIRES

**TOXICIDADE DO
HYDROXYMETHYLFURFURAL E
THIAMETHOXAM PARA *Apis mellifera*
Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

LAVRAS - MG

2013

EPIFÂNIO PORFIRO PIRES

**TOXICIDADE DO HYDROXYMETHYLFURFURAL E
THIAMETHOXAM PARA *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera:
Apidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. César Freire Carvalho

Coorientador

Dr. Stephan Malfitano Carvalho

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pires, Epifânio Porfiro.

Toxicidade do hidroximetilfurfural e thiametoxam para *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Epifânio Porfiro Pires. – Lavras : UFLA, 2013.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: César Freire Carvalho.

Bibliografia.

1. Abelha. 2. Furaldeído. 3. Neonicotinoide. 4. Inseticida. 5. Interação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 595.799

EPIFÂNIO PORFIRO PIRES

**TOXICIDADE DO HYDROXYMETHYLFURFURAL E
THIAMETHOXAM PARA *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera:
Apidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Ronelza Rodrigues da Costa Zaché

UFLA

Dr. Rogério Antônio Silva

EPAMIG

Dr. César Freire Carvalho
Orientador

LAVRAS - MG

2013

Aos meus familiares, à Daniele e amigos, pelo incentivo e apoio,
em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força proporcionada para concluir mais esta etapa da minha vida;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, por ter me proporcionado a oportunidade de realização do mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador, professor César Freire Carvalho, pelos ensinamentos e consideração. Muito obrigado pela oportunidade de crescimento e de aprendizagem ao longo dos anos;

Ao meu coorientador, professor Stephan Malfitano Carvalho, pela atenção e disponibilidade em todas as etapas do trabalho, sua consideração, foi o principal colaboradora deste trabalho;

Ao doutorando, Jander Rodrigues de Souza, que não mediu esforços e comprometimento para acompanhar e me instruíram para a realização e execução dos experimentos;

A toda minha família, e em especial a minha mãe, pela compreensão, amizade e apoio que sempre me proporcionou;

À Daniele e toda sua família, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado, dando-me forças e apoio nos momentos difíceis;

Aos membros da banca examinadora: professor Dr. César Freire Carvalho, Dra. Ronelza Rodrigues da Costa Zaché e Dr. Rogério Antônio Silva, por se disponibilizarem e lerem este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo;

Aos professores do Departamento de Entomologia da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência;

À professora Brígida Souza, pela amizade, valiosos ensinamentos e por ter acreditado na minha capacidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro;

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação de Agronomia/Entomologia, em especial Flávio, Ana Maria, Roberta Botelho, Andre, Maria Auxiliadora, Rebeca, Ricardo Tanque, Bruno Amaral, Mariana e Jander, pelo agradável convívio, e que junto a mim percorreram esta trajetória de muito esforço e aprendizado;

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, em especial à Nazaré e Elaine, pela colaboração em tudo que foi possível para a realização do experimento;

Ao professor René, por ter disponibilizado o laboratório de Toxicologia para a realização dos experimentos;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

Muito Obrigado.

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a toxicidade do hydroxymethylfurfural (HMF) e do thiamethoxam, bem como a interação entre os compostos para *Apis mellifera*. Os bioensaios foram realizados em delineamento casualizados, sendo que cada tratamento foi composto por cinco repetições, e sendo que cada, com 20 abelhas. Os tratamentos foram formados a partir de concentrações subletais, equivalentes a 1/10 e 1/100 da Loael ("Low observable effect level") do HMF e do thiamethoxam que foram fornecidos no alimento de maneira crônica e aguda. Para o tratamento controle, foi fornecido apenas solução de sacarose + H₂O (1:1) isento de quaisquer produtos. As abelhas foram obtidas no apiário do Departamento de Entomologia/UFLA, anestesiadas com CO₂ por dois minutos para montagem dos experimentos, sendo mantidas em câmara climática a 28± 2 °C, UR de 60±10% e escotofase de 24 h. Constatou-se que independente da concentração o HMF e o thiamethoxam foram tóxicos para as abelhas, sendo os efeitos mais pronunciados quando esses compostos foram fornecidos em associação. Observou-se que em função da dieta utilizada, há variação na sobrevivência dos adultos de *A. mellifera*. A maior sobrevivência foi observada quando as abelhas foram alimentadas com sacarose, seguido do açúcar invertido artesanal e açúcar invertido comercial (Gludex[®]) com médias de 228 horas, 216 horas e 207 horas, respectivamente.

Palavras-chave: Abelha. Formaldeído. Neonicotinoide. Interação.

ABSTRACT

The present work aimed at evaluating the toxicity of the hydroxymethylfurfural (HMF) and thiamethoxam, as well as the interaction between the compounds for *Apis mellifera*. The biotrials were performed in randomized design, with each treatment comprised of five replicates, each with 20 bees. The treatments were formed from sub-lethal concentrations, equivalent to 1/10 and 1/100 of Loael (Low observable effect level) of the HMF and thiamethoxam, which were provided in a chronic and acute manner in the food. For the control treatment, we provided only the solution of sucrose + H₂O (1:1), exempt of any product. The bees were obtained in the apiary of UFPA's Entomology Department, anesthetized with CO₂ for two minutes for the assembly of the experiments, maintained in climatic chamber at 28±2°C, RH of 60±10% and 24 hour scotophase. We observed that, independent of the concentration, HMF and thiamethoxam were toxic to the bees, with a more pronounced effect when these compounds were provided in association. We also observed that, in function of the diet used, there was variation in the survival of *A. mellifera* adults. A larger survival rate was verified when the bees were fed with sucrose, followed by artisanal invert sugar and commercial invert sugar (Gludex®) with averages of 228 hours, 216 hours and 207 hours, respectively.

Keywords: Bee. Furaldehyde. Neonicotinoid. Interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formula estrutural do hydroxymethylfurfural (HMF).....	19
Figura 2	Reação de produção do Hydroxymethylfurfural a partir da frutose (1, frutopiranoose; 2, frutofuranose; 3 e 4 estádios intermédios de desidratação (não isolado) e 5, hydroxymethylfurfural).....	21
Figura 3	Fórmula estrutural do thiamethoxam.....	24
Figura 4	Mortalidade (%) de <i>Apis mellifera</i> 24 e 48 horas após oferta de solução de sacarose contaminada com diferentes concentrações de hydroxymethylfurfural.....	34
Figura 5	Mortalidade (%) de <i>Apis mellifera</i> 72 horas após serem alimentadas com dieta contaminada com diferentes concentrações de hydroxymethylfurfural.....	35
Figura 6	Mortalidade (%) de <i>Apis mellifera</i> 72 horas após o início do fornecimento de dietas contaminadas com diferentes concentrações de thiamethoxam.....	36
Figura 7	Sobrevivência (%) de adultos de <i>Apis mellifera</i> após o fornecimento de sacarose contaminada com thiamethoxam, hydroxymethylfurfural ou a mistura dos compostos; em que as abelhas foram submetidas à exposição aguda por ingestão em diferentes concentrações.....	37
Figura 8	Sobrevivência (%) de adultos de <i>Apis mellifera</i> após o fornecimento de sacarose contaminada com thiamethoxam, hydroxymethylfurfural ou a mistura dos compostos; em as abelhas foram submetidas à exposição crônica por ingestão em diferentes concentrações.....	39

Figura 9	Sobrevivência (%) de adultos de <i>Apis mellifera</i> após o fornecimento do açúcar invertido comercial e artesanal e ambos contaminados ou com thiamethoxam submetidos à exposição aguda por ingestão em diferentes doses.....	41
Figura 10	Sobrevivência (%) de adultos de <i>Apis mellifera</i> após o fornecimento do açúcar invertido comercial e artesanal e ambos contaminados ou com thiamethoxam submetidos à exposição crônica por ingestão em diferentes doses	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Importância e manejo alimentar de <i>Apis mellifera</i>	15
2.2	Hydroxymethylfurfural.....	19
2.3	Inseticida thiamethoxam.....	22
2.4	Interação entre compostos.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Reagentes.....	28
3.2	Obtenção das abelhas.....	28
3.3	Determinação da Loael.....	28
3.3.1	Valor da Loael para o HMF.....	29
3.3.2	Valor da Loael para o thiamethoxam.....	30
3.4	Bioensaios para sobrevivência de <i>A. mellifera</i> expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação de ambos..	30
3.5	Bioensaios para sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal associados ou não com o thiamethoxam.....	31
3.6	Análise dos dados.....	31
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Pré-teste para determinações da concentração Loael para o hydroxymethylfurfural – HMF.....	33
4.1.1	Pré-teste para determinações da concentração Loael para o Thiamethoxam.....	35
4.2	Sobrevivência de <i>A. mellifera</i> expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação desses compostos em exposição aguda.....	36
4.2.1	Sobrevivência de <i>A. mellifera</i> expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação desses compostos em exposição crônica.....	38
4.3	Sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal e em associação com o thiamethoxam em exposição aguda.....	39
4.3.1	Sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal e em associação com o thiamethoxam em exposição crônica.....	41
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) são insetos de grande interesse agrônômico, ambiental e socioeconômico, que permitem a obtenção de grande valor econômico o mel, geleia real, pólen e própolis, além de polinizar inúmeras plantas, seja nos ambientes naturais e/ou agrícolas, proporcionando a fecundação cruzada, que tem como consequência, o aumento da produção e qualidade dos alimentos (BROMENSHENK et al., 1996; DELAPLANE; MAYER, 2005; HAJJAR; JARVIS; GEMMILL-HERREN, 2008).

As abelhas se alimentam basicamente de água, pólen e mel, sendo que o mel é obtido a partir da coleta de néctar das plantas assim como o pólen. Entretanto, em algumas épocas do ano, ocorre à escassez desses recursos, o que restringe o desenvolvimento das colmeias (HAYDAK, 1970; PEREIRA et al., 2006). Para minimizar a falta de alimentos, é comum, pelos apicultores, a utilização da alimentação suplementar, formulada de uma maneira geral a base de sacarose 50% (peso/volume). Entretanto, as abelhas não utilizam a sacarose sem que ela seja desdobrada, mesmo que parcialmente, em glicose e frutose. Para que ocorra essa inversão, as abelhas secretam enzimas nas glândulas hipofaríngeas, o que acarreta por parte do inseto, grandes gastos energéticos os quais pode afetar diretamente na sua sobrevivência (BARKER; LEHNER, 1978; CRANE, 1979).

Uma alternativa é o fornecimento de açúcar invertido, que pode ser comercial ou produzido de forma artesanal (PEREIRA et al., 2006; SCHAFASCHEK et al., 2008; BRIGHENTI et al., 2011). Essa solução é obtida por meio da hidrólise ácida da sacarose, também conhecida como inversão. Geralmente, o açúcar invertido é produzido a partir do aquecimento da solução composta de água, sacarose e um ácido alimentício, por exemplo, o tartárico ou

cítrico (BLANCHARD; GEIGER, 1984; BRIGHENTI et al., 2011). Contudo, durante o processo de inversão da sacarose devido ao aquecimento em excesso, pode ocorrer à formação do hydroxymethylfurfural (HMF), que é um composto tóxico para as abelhas (Le BLANC et al., 2009).

O HMF é uma substância naturalmente presente no mel e no xarope de açúcares invertidos, sendo que a partir da concentração de 150 mg L^{-1} , pode comprometer o desenvolvimento das colônias (PRANDIN et al., 2001), devido sua ação citotóxica, que pode provocar disenteria e danificação do epitélio do intestino médio das abelhas (BAILEY, 1966).

Outro fator prejudicial para as abelhas é o risco de exposição aos produtos fitossanitários utilizados na agricultura, para o controle de diferentes artrópodes-pragas, que também pode contaminar as abelhas pelo pólen, néctar ou exudados das plantas que possivelmente contenham resíduos desses compostos (GIROLAMI et al., 2009).

Dentre os inseticidas amplamente utilizados na agricultura, os compostos pertencentes ao grupo químico dos neonicotinoides merecem posição de destaque (MAIENFISCH et al., 2001; NAUEN et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Entre eles, destaca-se o thiamethoxam, que é empregado tanto para tratamento de sementes, aplicação no solo ou pulverização. Porém, diversos estudos salientam os efeitos tóxicos desse inseticida às abelhas. Carvalho et al. (2009) confirmaram a alta toxicidade desse composto, mostrando que, independentemente do modo de exposição (pulverização, ingestão e resíduo na superfície da cultura), o thiamethoxam ($37,5 \text{ ng de ia} / \mu\text{L}$) é extremamente tóxico para as abelhas, com uma média de TL_{50} de 3,57 horas.

Assim, devido à necessidade de manutenção das colônias de *A. mellifera* durante o período de escassez de alimento no campo, e com a prática de fornecimento de um alimento contendo o HMF, composto tóxico para as abelhas, somando-se o risco de contaminação com inseticidas, durante a coleta

de recursos, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a toxicidade de HMF e do thiamethoxam, fornecidos isolados ou em associação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância e manejo alimentar de *Apis mellifera*

As abelhas *A. mellifera* são exploradas tanto para a obtenção de produtos apícolas, como mel, própolis, cera, pólen e geleia real, quanto para a polinização das flores, que representa um serviço fundamental para produção agrícola, assim como para manutenção dos ecossistemas naturais, possibilitando a variabilidade genética das espécies e, conseqüentemente o aumento da produção de frutos e sementes (DANKA; RINDERER, 1986; DEJONG et al., 2006; HAJJAR; JARVIS; GEMMILL-HERREN, 2008; FREITAS; PINHEIRO, 2012). No cenário técnico-científico, as abelhas têm sido utilizadas tanto como organismos modelos para o estudo de funções cognitivas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; GIURFA, 2007) quanto bioindicadoras de distúrbios causadas pelo uso de produtos fitossanitários (MALASPINA et al., 2008; BADIOU-BENÉTÉAU et al., 2012). Dos agentes polinizadores, as abelhas são responsáveis pela polinização de aproximadamente 75% das espécies cultivadas comercialmente, o que representa cerca de 35% da produção mundial das culturas (KLEIN et al., 2007). Já as abelhas melíferas, permanecem como os principais polinizados mais utilizados nas monoculturas mundiais (WILLIAMS, 1994), o que representam cerca de 80% da polinização (CARRECK; WILLIAMS; LITTLE, 1997).

A criação de *A. mellifera* é uma atividade de grande importância, devido ao alto valor agregado de seus produtos (mel, própolis, cera, geleia real e aptoxina). Outro segmento da apicultura que está sendo explorado principalmente nos Estados Unidos e na Europa é o aluguel das colônias para a polinização, com a finalidade de aumentar a produção das culturas seja no campo e/ou cultivos protegidos (DANKA; RINDERER, 1986;

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA, FAO, 2004; DEJONG et al., 2006). Desse modo, o ato de coletar os recursos para a colônia, seja em ecossistemas naturais ou em áreas cultivadas, esses insetos acabam realizando a polinização, garantindo a fecundação cruzada e o fluxo gênico, além do aumento na produtividade de frutos e sementes (CARRECK; WILLIAMS LITTLE, 1997; KELLER; FLURI; IMDORF, 2005; DEJONG et al., 2006; GALLAI et al., 2009; BREEZE et al., 2011).

A alimentação das larvas e adultos de *A. mellifera* consiste em uma dieta a base de água, néctar e o pólen floral, bem como certos exsudados (HAYDAK, 1970; WOLFF, 2007; BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010). O néctar fornece os carboidratos necessários os quais são convertidos em mel que é estocado nos favos e utilizado como fonte de energia para suprir as necessidades da colmeia; o pólen supre as exigências de aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais para o desenvolvimento de sua estrutura corporal e a água cumpre papel de transporte e dissolução de substâncias, servindo de meio para várias reações químicas, além de auxiliar na regulação da temperatura e umidade dentro do ninho (HAYDAK, 1970; KELLER; FLURI; IMDORF, 2005; BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Para a obtenção de sua dieta alimentar, as operárias de *A. mellifera* visitam várias espécies vegetais durante o seu voo, devido ao fato de as plantas fornecerem diferentes valores nutricionais no néctar e no pólen (HAYDAK 1970; KELLER; FLURI; IMDORF, 2005). A coleta desses recursos ao longo do dia varia de acordo com as necessidades da colônia e sua disponibilidade no campo (FREE, 1980). Entretanto, em algumas épocas do ano as abelhas *A. mellifera* passam por períodos de queda na quantidade de pólen e néctar disponíveis no campo, devido às condições edafoclimáticas, ocorrendo uma redução na produção de mel e nos estoques de pólen nas colmeias, restando aos

enxames consumir as reservas estocadas nos favos (WOLFF, 2007). Pequenas variações diárias na quantidade de recursos alimentares coletados podem vir a influenciar no desenvolvimento das fases jovens, no entanto, oscilações maiores podem ter ainda efeitos mais agravantes (FREE, 1980; SCHAFASCHEK et al., 2008).

A ausência de pólen pode ocorrer em qualquer período do ano, seja perante aos fatores ambientais (DOULL, 1975), ou no momento em que as abelhas estão visitando plantas que produzem muito néctar e pouco pólen (JOHANSSON; JOHANSSON, 1977). Com relação ao néctar, a escassez pode ocorrer nos períodos em que se têm longos períodos de chuvas intensas e constantes, pois as flores podem perder o néctar, ou quando ocorrem longos períodos com baixas temperaturas em que as abelhas praticamente cessam suas atividades e não saem das colônias para realizarem o forrageio (LENGLER, 2000).

Contudo, devido ao intensivo manejo por parte dos apicultores, é comum às reservas alimentares dos enxames serem muito pequenas, insuficientes para todo o período de escassez (WOLFF, 2007). Devido à retirada do mel realizado pelos apicultores pode acabar ocasionando diversos danos à colônia como: desenvolvimento inadequado das glândulas hipofaríngeas e corpo gorduroso dos insetos; redução da longevidade; desequilíbrio entre a quantidade de adultos emergentes e as mortes; redução da distância percorrida durante os voos e diminuição da resistência às doenças (KELLER; FLURI; IMDORF, 2005; PEREIRA et al., 2006; ALAUX et al., 2010; BRIGHENTI et al., 2011).

Uma medida então adotada pelos apicultores para minimizar os efeitos da escassez de alimento, é a utilização da alimentação artificial. Esse tipo de alimentação resulta em uma série de benefícios para a colônia, pois garante um desenvolvimento contínuo e a manutenção de enxames fortalecidos, populosos

para as próximas floradas (RAAD, 2002; PEREIRA et al., 2006; WOLFF, 2007; RUIZ-MATUTE et al., 2010).

O fornecimento de dietas artificiais para as colônias pode variar de acordo com o produto final que o apicultor deseja obter. A sua eficiência pode ser observado no desenvolvimento da colônia, como o aumento na produção total de mel, desenvolvimento larval, oviposição produtividade e longevidade individual das abelhas operárias (SEVERSON; ERICKSON, 1984; WINSTON, 1987; DeGRANDI-HOFFMANH et al., 2008; BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Diversos são os alimentos utilizados no preparo da dieta artificial das abelhas tais como o farelo ou farinha de soja, levedura de cana-de-açúcar, farinha láctea, terneron (sucedâneo lácteo para bezerro), farelo de trigo, farelo de polpa de citros, rapadura (fornecida em forma de raspa), garapa de cana-de-açúcar, entre outros (LENGLER, 2000; PEREIRA et al., 2006). Outro produto muito utilizado e difundido entre os apicultores como alimento energético é o açúcar invertido, onde a sacarose é desdobrada em glicose e frutose por meio de uma hidrólise ácida (LENGLER, 2000; BRIGHENTI et al., 2011).

Contudo, sabe-se que as boas práticas do manejo alimentar são determinantes para o desenvolvimento das colônias. Devido às poucas informações existentes a respeito do processo de fabricação do açúcar invertido, no seu processo de fabricação devido à utilização exagerada de calor, pode haver a produção excessiva HMF, que em excesso afeta a qualidade do produto final (BAILEY, 1966; LeBLANC et al., 2009). Desse modo, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos do HMF no desenvolvimento das colônias.

2.2 Hydroxymethylfurfural

O HMF, 5-(hidroximetil)-2-furaldeído, é um aldeído cíclico de fórmula molecular $C_6H_6O_3$, densidade de $1,29 \text{ g cm}^{-3}$ e massa molar de $126,11 \text{ g mol}^{-1}$ (KUSTER, 1990) (Figura 1). É formado naturalmente como um intermediário na reação de Maillard (CAPUANO; FOGLIANO, 2011) por meio da desidratação de hexoses em condições ácidas, por exemplo, a conversão da sacarose em frutose e glicose. A formação de HMF é dependente da temperatura e pH (CORRADINI; CORRADINI, 1992).

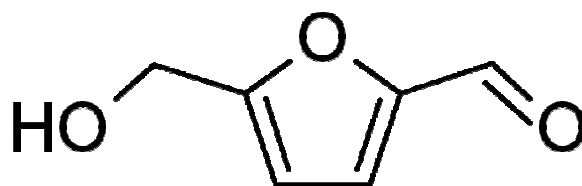


Figura 1 Fórmula estrutural do hydroxymethylfurfural (HMF)

O HMF pode estar presente em uma série de alimentos (processados e/ou naturais) os quais são submetidos a algum tipo de tratamento térmico. Os principais alimentos incluem mel, café, sucos de frutas, doces, bolos, massa de tomate, produtos processados, leite pasteurizado e bebidas alcoólicas (MORALES, 2009; CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

O HMF tem sido utilizado como um marcador para avaliar o superaquecimento, ao armazenamento ou práticas de adulteração do mel. Os Métodos colorimétricos foram desenvolvidos na década de 1950 para determinar o HMF em produtos lácteos que foram submetidos ao aquecimento. As técnicas proposta para sua análise são baseadas principalmente na Cromatografia Líquida

de Alta Pressão (HPLC) associada à detecção UV. Outras técnicas tais como eletroforese capilar, cromatografia iônica ou detecção fotométrica têm sido descritas (CORRADINI; CORRADINI, 1992).

HMF está naturalmente presente em mel, mesmo em temperatura ambiente, sendo aumentado após o tratamento térmico e/ou a temperaturas de armazenamento inadequadas (WHITE, 1994; FALLICO et al., 2004; ESCRICHE et al., 2008; BATH; SINGH, 2009). A quantificação do HMF foi o primeiro marcador a ser utilizado como um indicador de adulteração com xaropes invertido (SWALLOW; LOW, 1994), tratamento térmico excessivo, ou condições de armazenamento inadequadas (ESCRICHE et al., 2008, BATH; SINGH, 2009). O mel é submetido a tratamentos térmicos, por duas razões distintas: (i) para modificar a sua tendência para cristalizar ou retardar sua degradação e (ii) para reduzir a carga microbiana. Os teores de HMF têm sido utilizados como parâmetros nacionais e internacionais para avaliar a qualidade do produto e sua adulteração (MORALES, 2009).

O Codex Alimentarius e a União Europeia, estipulam que os níveis máximos de HMF no mel são de 40 mg kg⁻¹ e os oriundos dos trópicos de 15 e 80 mg kg⁻¹ (SPANO et al., 2009). O limite estabelecido pela legislação brasileira é de 60 mg kg⁻¹. Quando esses limites são ultrapassados, esse valor pode ser indicativo de superaquecimento, longa estocagem ou adulteração. Assim, para minimizar a formação do HMF é imprescindível a manipulação adequada do mel, de modo a obter o controle da concentração de HMF (CORRADINI; CORRADINI, 1992).

No açúcar invertido, o HMF pode originar-se pela inversão da sacarose e pela hidrólise ácida, catalisada por um ácido. O HMF pode ser produzido por meio de hexoses. Essas por sua vez podem ser obtidas a partir de oligossacarídeos e polissacarídeos na sua hidrólise, assim como em compostos que possuam tais substâncias (KUSTER, 1990) (Figura 2).

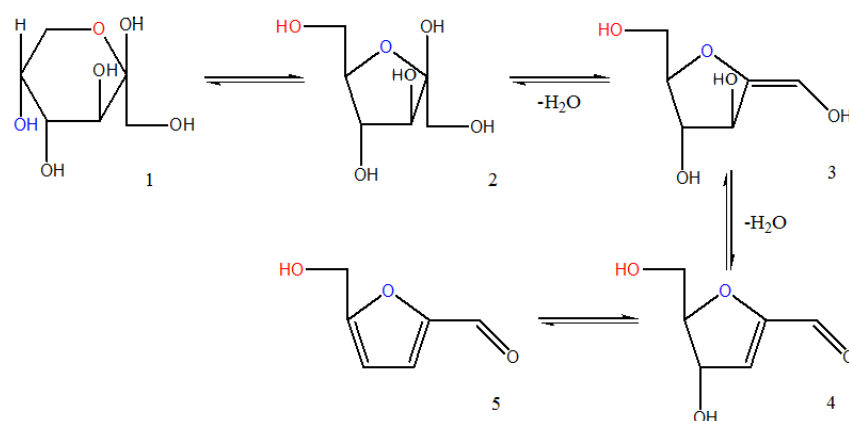


Figura 2 Reação de produção do Hydroxymethylfurfural a partir da frutose (1, frutopirranose; 2, frutofuranose; 3 e 4 estádios intermédios de desidratação (não isolado) e 5, hydroxymethylfurfural)

A reversão de açúcar é também um processo que resulta na produção do HMF. Trabalhos demonstram que quando se utiliza a frutose como precursor, ocorre um rendimento de 80% de HMF a mais quando comparado à glicose. A frutose apresenta na sua forma estrutural anéis menos estáveis, não havendo a forma de cadeia aberta em solução, e taxa de enolização comparativamente elevada. Quando é utilizada a glicose, a formação do HMF é menor, devido à forma estrutural de anel muito estável, em cadeia aberta, formado em solução onde a taxa de enolização é baixa (KUSTER, 1990; YONG; ZHANG; YING, 2008; QI; GUO; LI et al., 2011).

O HMF é considerado um composto tóxico e prejudicial tanto para a saúde humana quanto para das abelhas. Em humanos, altas concentrações de HMF podem apresentar atividade citotóxica, provocando irritação dos olhos, trato respiratório superior, pele e membranas mucosas, além de apresentar potencial genotóxico (MORALES, 2009). Bauer-Marinovic et al. (2012) trabalhando com duas linhagens de ratos observaram que após a oferta de uma

dose de 250 mg / kg de HMF, houve mortalidade da maioria dos indivíduos entre 5-11 dias devido a danos nos túbulos proximais. Em doses inferiores, administradas repetidamente, os túbulos foram afetados, apresentando indícios de regeneração, sendo observada posteriormente hiperplasia atípica. Além disso, efeitos hepatotóxicos, serosite de tecidos peritoneais e lesões no fígado, estômago, intestino, rins e baço foram observados. Glatt, Schneider e Liu (2005) mostram que o HMF pode apresentar efeito genotóxicos, causando a indução da trocas das cromátides irmã para ratos. Glatt e Sommer (2006) deduziram que o HMF induz mutações no DNA de ratos selvagem, o que pode causar tumores hepáticos nas fêmeas.

Bailey (1966) e LeBlanc et al. (2009) observaram que as abelhas alimentadas com dieta contendo o HMF apresentaram sinais de intoxicação e danos no intestino médio, tal como ulceração, causando dificuldade de alimentação e disenteria. Prandin et al. (2001) mostrou que os efeitos tóxicos do HMF para as abelhas podem ocorrer a partir de uma concentração superior a 150 mg L⁻¹.

2.3 Inseticida thiamethoxam

Os inseticidas neonicotinoides representam a classe de inseticidas que mais cresceu no mercado desde o lançamento dos piretroides (NAUEN; BRETSCHNEIDER, 2002). Esses compostos, na última década, tiveram uma grande expansão, tornando-se a maior classe de inseticidas usada na prevenção e controle de insetos – praga (NAUEN et al., 2001). A aparente garantia da utilização desses produtos deve-se em grande parte à sua maior afinidade aos receptores nicotínicos dos insetos em comparação com aqueles dos vertebrados, causando menores efeitos secundários que outras classes de inseticidas (MAIENFISCH et al., 2001).

A classe dos neonicotinoides teve origem a partir da molécula de nicotina, extraída das plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). O primeiro composto dessa classe a ser comercializado foi o imidacloprid, introduzido na Europa e no Japão em 1990 pela Bayer CropScience®, que juntamente com o nitenpyram e o acetamiprid representam a subclasse das cloronicotinilas, também conhecidos com neonicotinoides de primeira geração (NAUEN et al., 2001). Os outros compostos pertencentes a essa classe são o acetamiprid, thiacloprid, clothianidin, dinotefuran e thiamethoxam, que formaram a segunda geração dos neonicotinoides ou subclasse tionicotinilas (MAIENFISCH et al., 2001; NAUEN et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; BLACQUIÈRE et al., 2012).

Comercialmente, os produtos formulados a base do thiamethoxam foram disponibilizados pela Syngenta® a partir de 1998, sendo registrado para utilização nas culturas do algodoeiro, cafeeiro, citros, soja e rosáceas, é indicado para o controle de insetos-praga de ocorrência na parte aérea, como os pulgões, moscas brancas, tripses, coleópteros e algumas espécies de lepidópteros (ANDREI, 2009). Outra característica interessante da molécula é a versatilidade de utilização, sendo empregado no tratamento de sementes, aplicação via solo, pulverização e/ou aplicação no colo da planta (MAIENFISCH et al., 2001).

O thiamethoxam, (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1, 3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amin), é um composto cristalino e inodoro, com ponto de fusão de 139,1 °C, baixa massa molar (291,72 g mol⁻¹), solubilidade relativamente alta em água (4,1 g L⁻¹ a 25°C) e formula C₈H₁₀ClN₅O₃S (Figura 3).

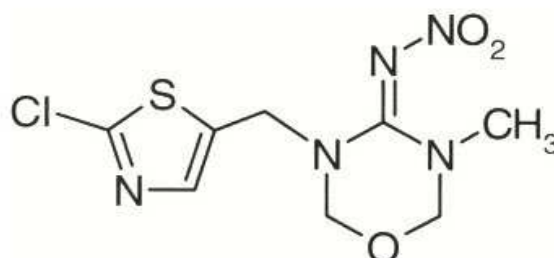


Figura 3 Fórmula estrutural do thiamethoxam

Dentre as diversas rotas de metabolização e/ou degradação, verifica-se que o thiamethoxam apresenta um tempo de meia vida menor que uma hora, e é degradado por ação da fotólise (MAIENFISCH et al., 2001). O inseticida thiamethoxam mimetiza no organismo dos insetos a ação da acetilcolina, ou seja, é um agonista do receptor nicotínico da acetilcolina (nAChR) (ELBERT et al., 2008), levando o inseto a morte por hiperexcitação do sistema nervoso (NAUEN; BRETSCHEIDER, 2002).

No cenário eco toxicológico, o inseticida thiamethoxam possui baixa toxicidade aguda a mamíferos, não irrita a pele e os olhos, além de não ser bioacumulável. Entretanto, diversos estudos demonstram que esse neonicotinoide é tóxico para *A. mellifera* (MAIENFISCH et al., 2001). Iwasa et al. (2004) avaliando os efeitos toxicológicos de setes neonicotinoides, verificaram que o composto thiamethoxan, que possui o agrupamento N-nitroguanidina, chega a ser 192 vezes mais tóxicos que o acetamiprid e thiacloprid, os quais possuem o radical N-ciano-amidina. Esses autores sugerem que a baixa toxicidade do acetamiprid e thiacloprid às abelhas pode estar associada à alta capacidade de detoxificação dessas moléculas mediada pelas enzimas dependente do citocromo P450. Nesse estudo, a dose letal (DL_{50}) do thiamethoxam para as operárias foi de 30 ng i.a./abelha.

Antunes-Kenyon e Kennedy (2001) observaram que independente da forma de contaminação das abelhas, o thiamethoxam demonstrou ser extremamente tóxico para abelhas, provocando a morte de mais de 80% dos espécimes após 3 dias. Carvalho et al. (2009) observaram que independente do modo de exposição das abelhas (pulverização, ingestão e resíduo), o thiamethoxam mostrou ser extremamente tóxico na concentração de 37,5g i.a./100 L água com tempo letal de 50% da população de médio de 3,57 horas (TL₅₀).

2.4 Interação entre compostos

Na agricultura moderna, de modo a diminuir os custos de aplicação, tem sido utilizado à mistura em tanque de produtos fitossanitários (THOMPSON, 1996). De acordo com a Instrução Normativa N° 46 SDA / MAPA – 26.07.2002 (BRASIL, 2011) essa técnica é definida como: “associação de agrotóxicos e afins no tanque do equipamento aplicador, imediatamente antes da aplicação”. Entretanto esse tipo de aplicação de maneira conjunta pode acarretar aumento da toxicidade dos compostos (PILLING; JEPSON, 1993; SCHMUCK; STADLER; SCHMIDT, 2003; QUEIROZ; MARTINS; CUNHA, 2008).

A ação de duas substâncias administradas concomitantemente pode ser definida como sendo uma interação onde a resposta é superior/inferior de quando essas substâncias são administradas isoladamente. No âmbito toxicológico, podem-se verificar dois tipos de ação. Em um primeiro caso ocorre o sinergismo ou a potencialização de uma resposta quando dois ou mais compostos são aplicados em associação. Por outro lado, podemos observar uma redução da resposta, ou antagonismo, no momento em que duas ou mais substâncias são administradas conjuntamente (METCALF, 1967; PILLING; JEPSON, 1993).

Especificamente em relação às abelhas, alguns estudos descrevem o efeito sinérgico dos inseticidas e fungicidas, os quais administrados em associação provocam alta mortalidade em comparação quando aplicados isoladamente. Grande é o interesse em conhecer tais efeitos, visto que muitas das vezes é uma prática corriqueira por parte do agricultor em aplicar misturas de produtos fitossanitários (inseticida com fungicida, inseticida com herbicida etc.), o que pode agravar os efeitos tóxicos.

Pesquisa realizada por Colin e Belzunces (1992) verificou que deltamethrin ou procloraz aplicados isoladamente, não provocaram mortalidade de abelhas diferente daquela obtida no tratamento com água, entretanto, quando administrado em associação, verificou-se o efeito sinérgico do procloraz, alcançando índices de mortalidade das abelhas superior a 70%. Estudos realizados por Pilling et al. (1995) concluíram que vários fungicidas inibidores da síntese de ergosterol são potenciais sinérgicos da lambda-cialotrina, contudo em trabalhos laboratoriais demonstraram que essas associações podem provocar mortalidade das abelhas da ordem de 1,5 a 16,3 maiores do que quando aplicados isoladamente.

Após os relatos de desaparecimento de abelhas em países do hemisfério Norte (NEUMANN; CARRECK, 2010), novas hipóteses foram levantadas buscando elucidar os fatos. Indiscutivelmente os produtos fitossanitários são responsáveis por grande parte das intoxicações das abelhas, mas acredita-se que eles não atuam isoladamente mais em associação com outras substâncias e até mesmo microrganismos (STOKSTAD, 2012). Nesse sentido, Alaux et al. (2010) estudaram o efeito sinérgico entre o inseticida imidacloprid e o microsporídeo *Nosema ceranae*, comprovando que essa associação é responsável pelo enfraquecimento das abelhas por meio de alterações no metabolismo energético, podendo até mesmo levar a morte desse polinizador. Com o mesmo propósito, Vidau et al. (2011) comprovaram que abelhas infectadas com esporos de *N.*

ceranae e posteriormente contaminadas com fipronil ou thiacloprid, apresentam menor longevidade que aquelas abelhas não infectadas mais tratadas com os inseticidas. Em ambos os casos os pesquisadores foram unânimes em concordar que a interação entre inseticida e um microrganismo entomopatogênico, culmina na redução da capacidade imunológica da abelha, acarretando sua morte prematura.

No estudo realizado por Schmuck, Stadler e Schmidt, (2003) verificaram um acréscimo na mortalidade de *A. mellifera* quando o thiacloprid e cyprodinil foram aplicados em associação causando a mortalidade de 20% da população 24 horas após a aplicação. Em contrapartida, quando o thiacloprid foi aplicado em associação com os fungicidas prochloraz e tebuconazole houve um aumento considerável causando mortalidade de 80% e 70% respectivamente após 24 horas da aplicação, sugerindo um possível efeito sinérgico entre esses compostos.

Assim, conhecendo do risco de exposição das abelhas ao HMF (Le BLANC et al., 2009) quanto ao thiamethoxam (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012), são necessários que estudos toxicológicos sejam realizados para verificar a existência da associação entre esses compostos e os efeitos em *A. mellifera*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O inseticida thiamethoxam (92,5%) (Syngenta Cropsience[®], Brasil) e o HMF (5-(hidroximetil)-2-furaldeído) foram obtidos na Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, EUA). A sacarose utilizada no preparo do alimento foi obtida na LabSynth[®] (Brasil). O açúcar invertido comercial Gludex[®] 201 foi obtido na Dulcini[®] (Pirassununga, Brasil) e o açúcar invertido artesanal foi formulado segundo a metodologia proposta por Brighenti et al. (2011).

3.2 Obtenção das abelhas

As abelhas *A. mellifera* foram obtidas no apiário do Departamento de Entomologia/UFLA, em colmeias manejadas e livres de doenças. Os adultos campeiros foram coletados na melgueira de colônia equipada com tela excludora, sendo que nos quadros não exista a presença de nenhuma fase de desenvolvimento do inseto (ovo, larva ou pupa), mas somente alimento.

Após a coleta dos insetos, os mesmos foram transportados com auxílio de gaiolas de PVC de 30 cm de altura x 20 cm de diâmetro e encaminhados para o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Entomologia (DEN) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG para a realização dos ensaios de toxicidade.

3.3 Determinação da Loael

Determinou-se a Loael ("Low observable effect level"), que é um dos parâmetros utilizados na toxicologia. Essa é definida como a menor dose,

concentração ou quantidade de substância capaz de provocar algum efeito visível, causando alteração no crescimento, desenvolvimento e/ou fisiologia, até mesmo a morte do organismo (ZARN; ENGELI; SCHLATTER, 2011).

3.3.1 Valor da Loael para o HMF

Para obtenção do valor da Loael do HMF, primeiramente, uma solução estoque de 10.000 ng/ μ L utilizando água destilada como solvente foi realizada. A partir dessa, foram preparadas diversas outras diluições, desta vez usando como solvente a dieta de sacarose e água destilada na proporção de 1:1 (peso/volume).

O tratamento controle foi constituído apenas da solução de sacarose e água destilada. As concentrações de HMF utilizadas foram: 1×10^{-7} ng, 1×10^{-5} ng, 0,001 ng, 0,01ng, 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng e 1000 ng i.a μ L⁻¹ na dieta, que posteriormente foram ofertadas para *A. mellifera* de maneira contínua, sendo suposto que dentro dessa faixa seria possível determinar a Loael.

As abelhas foram anestesiadas com CO₂ por 2 minutos, em seguida foram individualizadas em gaiolas de plástico de 500 mL, em que cada tratamento foi constituído por cinco repetições, sendo cada parcela representada por uma gaiola com 20 abelhas por repetição, somando 100 abelhas por tratamento, totalizando 1000 abelhas se considerarmos as nove concentrações de HMF e o tratamento controle.

As gaiolas foram acondicionadas em câmara climática a 28 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$, escotofase 24 h. Após 24; 48 e 72 horas do fornecimento do alimento de maneira contínua, o número de abelhas mortas por gaiola foi contabilizado. Foram consideradas mortas apenas aquelas abelhas que não responderem a nenhum estímulo mecânico.

3.3.2 Valor da Loael para o thiamethoxam

Para obtenção do valor da Loael do thiamethoxam, primeiramente, uma solução estoque de 1.000 ng/ μ L utilizando acetona como solvente foi realizada (5 mg de thiamethoxam + 5 mL acetona). A partir dessa, foram preparadas diversas outras diluições, desta vez usando como solvente a dieta de sacarose e água destilada na proporção de 1:1 (peso/volume). O tratamento controle foi constituído apenas da solução de sacarose e água destilada. Para thiamethoxam, as concentrações foram de 5×10^{-7} ng, 5×10^{-6} ng, 5×10^{-5} ng, 5×10^{-4} ng, 0,005 ng, 0,05 ng, 0,5 ng, 5 ng e 50 ng i.a μ L⁻¹ oferecido na dieta ofertadas para *A. mellifera*. Sendo realizado o mesmo procedimento descrito no subitem 3.3.1.

3.4 Bioensaios para sobrevivência de *A. mellifera* expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação de ambos

Assumindo o valor da Loael como referência para continuidade dos experimentos, foi realizada a determinação da possível interação entre o HMF e o thiamethoxam. Após a determinação do valor da Loael Para o HMF e thiamethoxam 1×10^{-7} i.a μ L⁻¹ e 5×10^{-7} i.a μ L⁻¹ respectivamente, foi realizado um bioensaio para avaliar a possível interação entre os compostos, em que os tratamentos foram: Controle (Solução de sacarose e água destilada), HMF Loael, HMF Loael/100, thiamethoxam Loael, HMF Loael associado com thiamethoxam Loael/100, thiamethoxam Loael/100, HMF Loael/100 associado com thiamethoxam Loael e HMF Loael/100 associado com thiamethoxam Loael/100.

Ao longo do tempo, as abelhas foram alimentadas *ad libitum* com o respectivo tratamento, sendo a sobrevivência avaliada ao longo do tempo até a

morte de todos os insetos. Cada parcela amostral foi formada por 20 abelhas, sendo cinco repetições por tratamento, totalizando 100 insetos/tratamento e 1000 abelhas considerando a soma de todos os tratamentos. As gaiolas foram acondicionadas em câmara climática a 28 ± 2 °C, UR de $60\pm 10\%$, escotofase 24 horas .

3.5 Bioensaios para sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal associados ou não com o thiamethoxam

Com a finalidade de avaliar o efeito da contaminação do açúcar invertido com o thiamethoxam, nesse bioensaio a sobrevivência das abelhas foi avaliada ao longo do tempo, sendo ofertados os seguintes tratamentos:

Controle (Solução de sacarose e água destilada), Açúcar Invertido Artesanal, Açúcar Invertido Artesanal contaminado com thiamethoxam Loael, Açúcar Invertido Artesanal contaminado com thiamethoxam Loael/100, Açúcar Invertido Comercial, Açúcar Invertido Comercial contaminado com thiamethoxam Loael e Açúcar Invertido Comercial contaminado com thiamethoxam Loael/100.

Ao longo do tempo, as abelhas foram alimentadas *ad libitum* com o respectivo tratamento, sendo a sobrevivência avaliada até a morte de todas as abelhas. Cada parcela amostral foi formada por 20 abelhas, sendo cinco repetições por tratamento. As gaiolas foram acondicionadas em câmara climática a 28 ± 2 °C, UR de $60\pm 10\%$ e escotofase 24 horas.

3.6 Análise dos dados

Os bioensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo que todas as análises foram realizadas pelo software R®

(RIBEIRO JUNIOR, 2012). Os dados de mortalidade foram plotados em função do tempo, sendo apresentadas médias seguidas de desvio padrão, que posteriormente submetidas à análise do tipo dose-resposta, empregando-se o pacote “drc” (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005). De posse do modelo matemático, os valores de referência da Loael e a Loael/100 foram determinados.

Nos experimentos de sobrevivência dos adultos foram realizadas medidas repetidas no tempo e os dados submetidos à análise de sobrevivência usando o pacote “Survival” (THERNEAU; LUMLEY, 2012). Com a escolha dos melhores modelos e realização de análise de contraste para verificar a semelhança entre os tratamentos, foram calculados os respectivos tempos letais 50 (TL₅₀). Posteriormente os dados foram avaliados pela rotina GLM (“Generalized Linear Models”) seguindo distribuição binomial, sendo que em caso de diferença entre os diversos tratamentos, esses foram avaliados por meio de contraste de médias.

4 RESULTADOS

4.1 Pré-teste para determinações da concentração Loael para o hydroxymethylfurfural – HMF

Após 24 horas da oferta do alimento contaminado, verificou-se que a menor concentração que causou mortalidade de *A mellifera* foi de 10 ng a.i μL^{-1} , aproximadamente 5% (Figura 4). Para 48 horas, observou o aumento da mortalidade das abelhas, contudo não foi possível determinar uma relação dose-efeito devido à grande variação entre as médias obtidas (Figura 4).

Entretanto, após 72 horas da oferta do alimento contaminado para *A. mellifera*, ocorreu acréscimo na mortalidade dos insetos, sendo que para a concentração de 1×10^{-7} ng a.i μL^{-1} de HMF a mortalidade foi superior a 60%, assim como as demais concentrações apresentaram mortalidade entre 60% e 80% dos insetos (Figura 5).

Assim como os valores obtidos para 24 e 48 após a oferta do alimento contaminado para as abelhas, na avaliação de 72 horas não foi possível determinar uma relação dose-efeito devido à grande variação entre as médias obtidas (Figura 4 e 5).

Entretanto, devido à necessidade de obtenção de um valor confiável para dar continuidade aos estudos de toxicidade do HMF, em que esse valor fosse repetido, a partir dos resultados até então encontrados, foi estabelecido no tempo de 72 horas como referência, a menor dose que causou efeito, que correspondeu a 1×10^{-7} ng a.i μL^{-1} , ou seja, Loael (Figura 5).

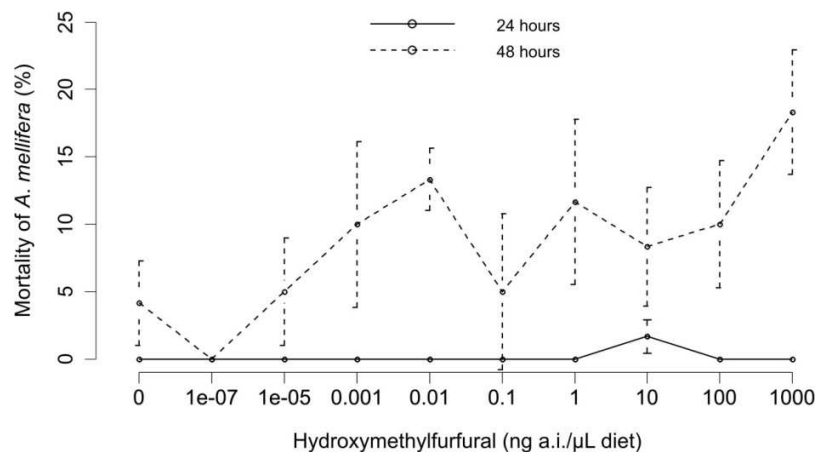


Figura 4 Mortalidade (%) de *Apis mellifera* 24 e 48 horas após oferta de solução de sacarose contaminada com diferentes concentrações de hydroxymethylfurfural

Assim, com os resultados obtidos, foi assumido como ponto de referência a Loael (1×10^{-7} ng a.i. μL^{-1}) após 72 horas da oferta da dieta contaminada para *A. mellifera* (Figura 5), por ser um valor confiável, evitando demais tipos de interferência, por exemplo, o estresse dos insetos devido aos longos períodos de confinamento.

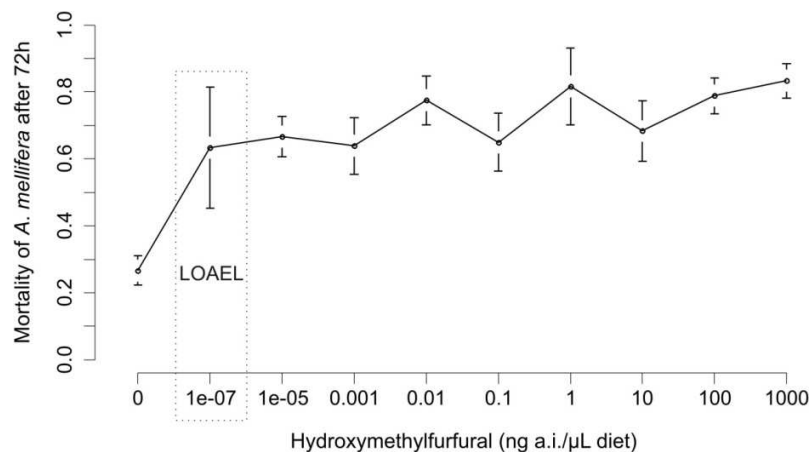


Figura 5 Mortalidade (%) de *Apis mellifera* 72 horas após serem alimentadas com dieta contaminada com diferentes concentrações de hydroxymethylfurfural

4.1.1 Pré-teste para determinações da concentração Loael para o Thiamethoxam

Para padronização, conforme no bioensaio do HMF, a mortalidade (%) de *A. mellifera* foi obtida após 72 horas da oferta do alimento contaminado. Desse modo, a menor concentração que causou mortalidade no referido tempo foi a de 5×10^{-7} ng a.i μL^{-1} , assumindo assim, esse valor como sendo Loael para o inseticida (Figura 6).

As concentrações entre 5×10^{-7} a 0,005 ng a.i μL^{-1} causaram mortalidade em torno de 50%. Na concentração 0,5 ng a.i μL^{-1} foi de 80%, e a partir de 5 ng a.i μL^{-1} atingiu 100% dos insetos (Figura 6).

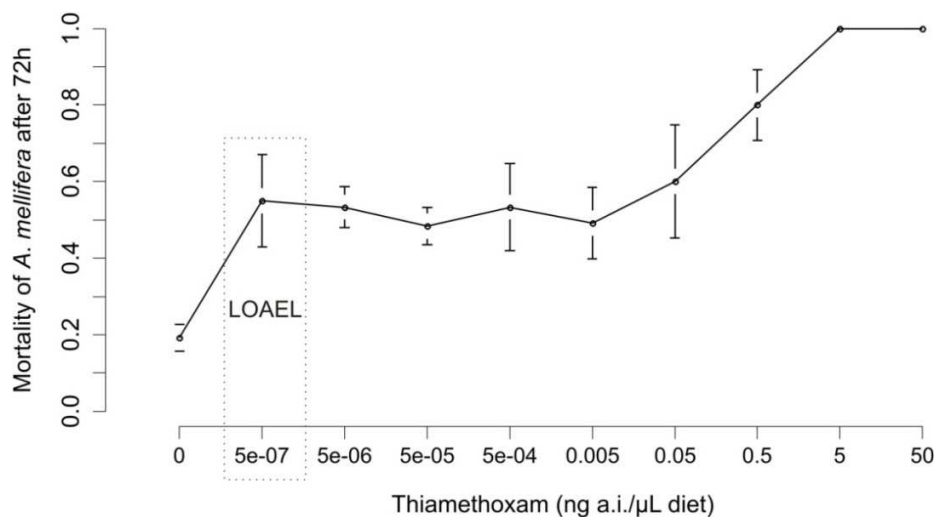


Figura 6 Mortalidade (%) de *Apis mellifera* 72 horas após o início do fornecimento de dietas contaminadas com diferentes concentrações de thiamethoxam

4.2 Sobrevivência de *A. mellifera* expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação desses compostos em exposição aguda

Após o teste de contraste de modelos, foi possível verificar a semelhança entre os tratamentos com a formação de três grupos. O primeiro foi formado pelo tratamento controle; o segundo pelo HMF associado com thiamethoxam Loael/100 e o HMF Loael; e o terceiro foi formado pelo thiamethoxam Loael, HMF associado com thiamethoxam Loael, HMF Loael/100 e thiamethoxam Loael/100 (Figura 7).

Para as primeiras 78 horas após a oferta da solução de sacarose, cerca de 80% das abelhas continuavam vivas, sendo observado tempo letal 50% (TL₅₀) apenas 100,18 horas após a oferta do alimento, e com tempo de sobrevivência de 234 horas. Com relação ao segundo grupo foi observado que a TL₅₀ foi de 66,75 horas, e que após 126 horas da oferta do alimento contaminado todos os insetos

estavam mortos. Para o terceiro grupo, o tempo letal foi de 52,46 horas, e após 198 horas todos os espécimes expostos ao alimento contaminado estavam mortos (Figura 7).

Nos tratamentos com a associação do thiamethoxam e HMF foi possível observar a toxicidade para as abelhas. Esses tratamentos, a partir das primeiras horas causaram distúrbios de coordenação motora, incapacidade de voo, permanência no fundo da gaiola parada com as asas vibrando, dificuldade de alimentação e disenteria, sugerindo assim um possível efeito sinérgico.

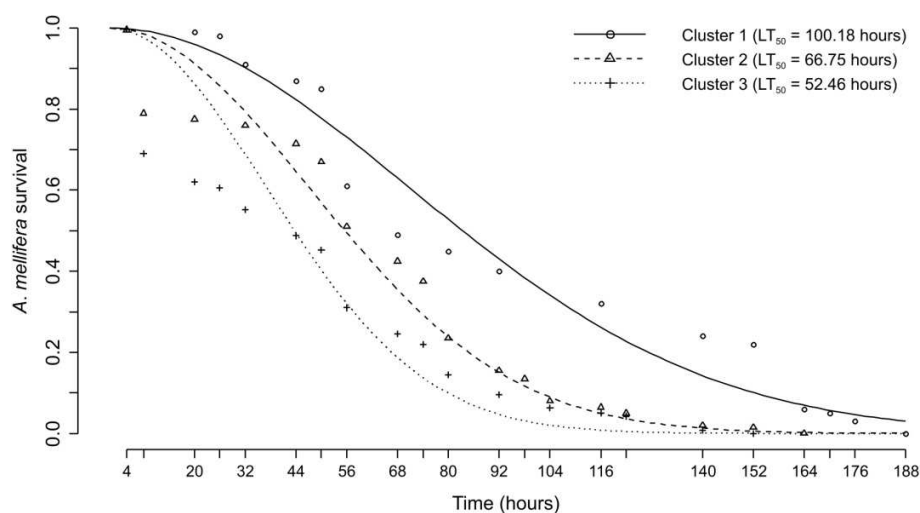


Figura 7 Sobrevivência (%) de adultos de *Apis mellifera* após o fornecimento de sacarose contaminada com thiamethoxam, hydroxymethylfurfural ou a mistura dos compostos; em que as abelhas foram submetidas à exposição aguda por ingestão em diferentes concentrações

Nota: Cluster 1: (Controle); Cluster 2: (HMF Loael/100 associado com thiamethoxam Loael/100) e (HMF Loael); Cluster 3: (thiamethoxam Loael); (HMF Loael associado com thiamethoxam Loael), (HMF Loael/100) e (thiamethoxam Loael/100), N= 700 abelhas/médias \pm DP 5 repetições. Dados submetidos à análise de contraste de modelos ($P \leq 0,05$).

4.2.1 Sobrevivência de *A. mellifera* expostas ao thiamethoxam, hydroxymethylfurfural e a combinação desses compostos em exposição crônica

Após o teste de contraste de modelos foi possível observar a formação de quatro grupos quando o alimento foi fornecido de forma crônica. O primeiro grupo (Cluster) foi formado apenas pelo tratamento controle; o segundo por HMF Loael associado com thiamethoxam Loael e pelo HMF Loael; o terceiro grupo foi formado pelo HMF Loael/100, thiamethoxam Loael/100 e o quarto grupo pelo thiamethoxam Loael e o HMF associado com thiamethoxam Loael (Figura 8).

O tratamento controle apresentou TL₅₀ de 99,78 horas, e sobrevivência de 194 horas após a oferta do alimento. Para o segundo grupo a TL₅₀ foi de 55,26, sendo entre os quatro grupos aquele que precisou de menor espaço de tempo para matar metade da população, sendo que após 128 horas praticamente todas as abelhas estavam mortas. A TL₅₀ do terceiro grupo foi de 80,16 horas, sendo que esse grupo representa o HMF Loael/100, thiamethoxam Loael/100, contudo após 152 horas todos os insetos estavam mortos. Com relação ao quarto grupo a TL₅₀ foi de 69,34 horas, em que com 32 horas após a oferta do alimento contaminado 80% dos insetos continuavam vivos, após 92 horas apenas 20% das abelhas estavam vivas (Figura 8).

O HMF e o thiamethoxam quando foram fornecidos de maneira crônica, demonstraram alta toxicidade para *A. mellifera*. Quando esses foram fornecidos em associação, causaram redução na sobrevivência das abelhas reduzindo o TL₅₀ (Figura 8).

Nas primeiras horas após o fornecimento do alimento contaminado com a associação do thiamethoxam com o HMF a partir das primeiras horas causaram sintomas de intoxicação como distúrbios de coordenação motora, incapacidade de voo, e prostração dos insetos no fundo da gaiola, dificuldade de

alimentação e disenteria, sendo esses sintomas mais pronunciados que aqueles observados no bioensaio agudo, sugerindo assim um possível efeito sinérgico.

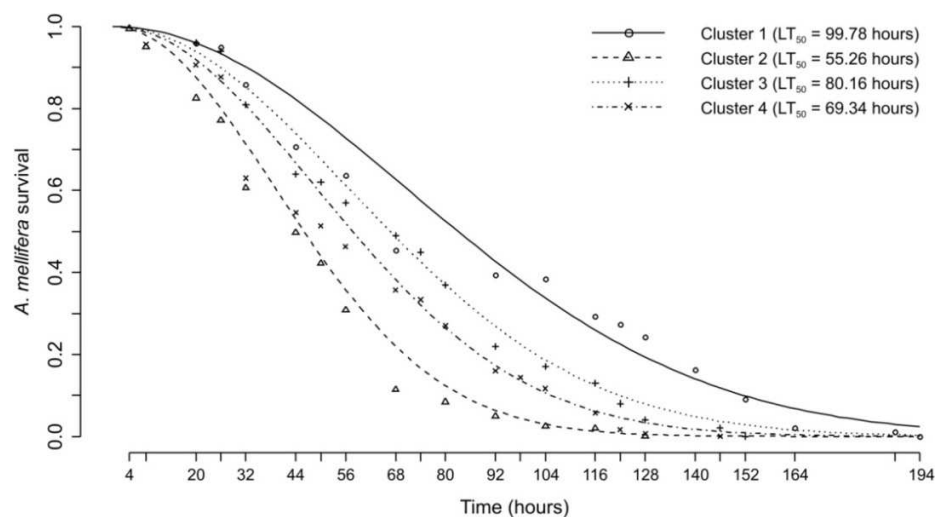


Figura 8 Sobrevivência (%) de adultos de *Apis mellifera* após o fornecimento de sacarose contaminada com tiametoxam, hydroxymethylfurfural ou a mistura dos compostos; em as abelhas foram submetidas à exposição crônica por ingestão em diferentes concentrações

Nota: Cluster 1: (Controle); Cluster 2: (HMF associado com tiametoxam Loael e HMF Loael); Cluster 3: (HMF Loael/100); Cluster 4: (tiametoxam Loael 100), (tiametoxam Loael) e (HMF associado com tiametoxam Loael/100), N=700 abelhas/médias \pm DP 5 repetições. Dados submetidos à análise de contraste de modelos ($P \leq 0,05$)

4.3 Sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal e em associação com o tiametoxam em exposição aguda

No bioensaio de exposição aguda para alimentação de *A. mellifera*, de acordo com a análise de contraste foi possível observar a formação de dois grupos. O primeiro grupo composto controle, açúcar invertido comercial e o açúcar invertido artesanal, e o segundo grupo pela associação do açúcar

invertido artesanalmente com o thiamethoxam Loael, açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael/100, açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael e açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael/100 (Figura 9).

Para o grupo 1 a TL_{50} foi de 128,12 horas, de modo que até 90 horas após a oferta do alimento para *A. mellifera* aproximadamente 70% dos insetos permaneceram vivos, contudo após 186 horas da oferta da dieta menos de 10% das abelhas estavam vivas, em que todas as abelhas morreram até 246 horas. Para o grupo 2, com apenas 42 horas da oferta da solução de sacarose com os diferentes tratamentos, aproximadamente 20% das abelhas já tinha morrido, sendo que a TL_{50} para o grupo de 74,52 horas, e com 102 horas 90% dos insetos já tinham morrido (Figura 9).

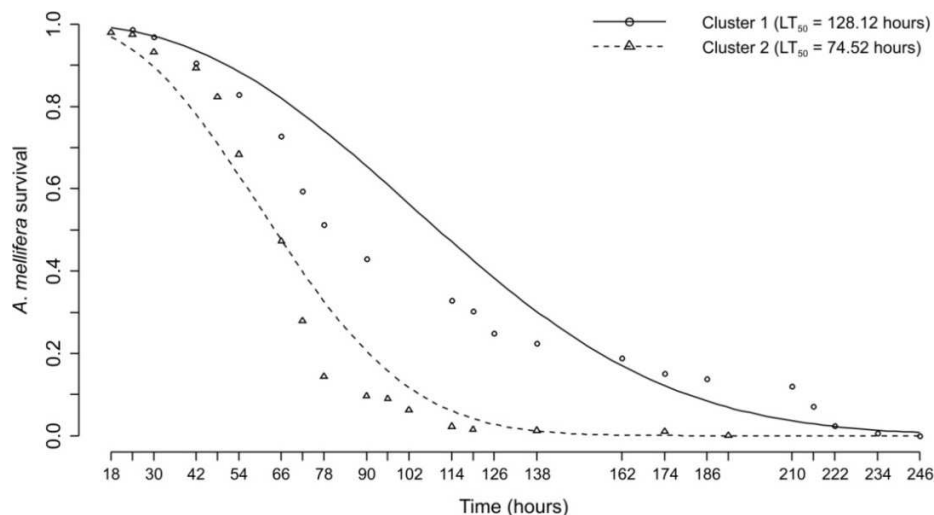


Figura 9 Sobrevivência (%) de adultos de *Apis mellifera* após o fornecimento do açúcar invertido comercial e artesanal e ambos contaminados ou com thiamethoxam submetidos à exposição aguda por ingestão em diferentes doses

Nota: Cluster 1: (controle), (açúcar invertido comercial) e (açúcar invertido artesanal); Cluster 2: (açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael/100), (açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael/100), (açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael) e (açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael), N= 700 abelhas/médias \pm DP 5 repetições. Dados submetidos à análise de contraste de modelos ($P \leq 0,05$).

4.3.1 Sobrevivência de abelhas alimentadas com açúcar invertido comercial e artesanal e em associação com o thiamethoxam em exposição crônica

Três grupos foram formados, sendo o grupo 1 formado pelo tratamento controle e o açúcar invertido artesanal; o grupo 2 pelos açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael, açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael, açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael/100 e açúcar invertido artesanal associado com

thiamethoxam Loael/100, e o grupo 3 composto pelo açúcar invertido comercial (Figura 10).

Para o grupo 1 a TL_{50} foi de 133,49 horas em que após 90 horas da oferta do alimento contaminado aproximadamente 80% dos insetos continuavam vivos, sendo que foram registrados insetos vivos até 234 horas após a oferta do alimento. Com relação ao grupo 2 a TL_{50} foi de 74,14 horas, sendo que após 90 horas da exposição das dietas contaminadas apenas aproximadamente 15% das abelhas continuavam vivas, em que após 150 horas todas as abelhas já se encontravam mortas. Para o grupo 3, a TL_{50} foi de 112,51 horas, posteriormente a 150 horas 20% dos insetos ainda continuavam vivos, contudo após 186 horas praticamente todos os insetos que foram alimentados com os compostos estavam mortos (Figura 10).

Observou-se que em função da dieta utilizada, há uma variação considerável na sobrevivência das abelhas. A maior sobrevivência foi observada quando as abelhas foram alimentadas com sacarose, seguido do açúcar invertido artesanal e pelo açúcar invertido comercial. De acordo com a análise de contraste de modelos, a sacarose foi agrupada com o açúcar invertido artesanal apresentando TL_{50} de 133,49 e o açúcar invertido comercial em outro grupo com TL_{50} de 112,5 horas (Figura 10).

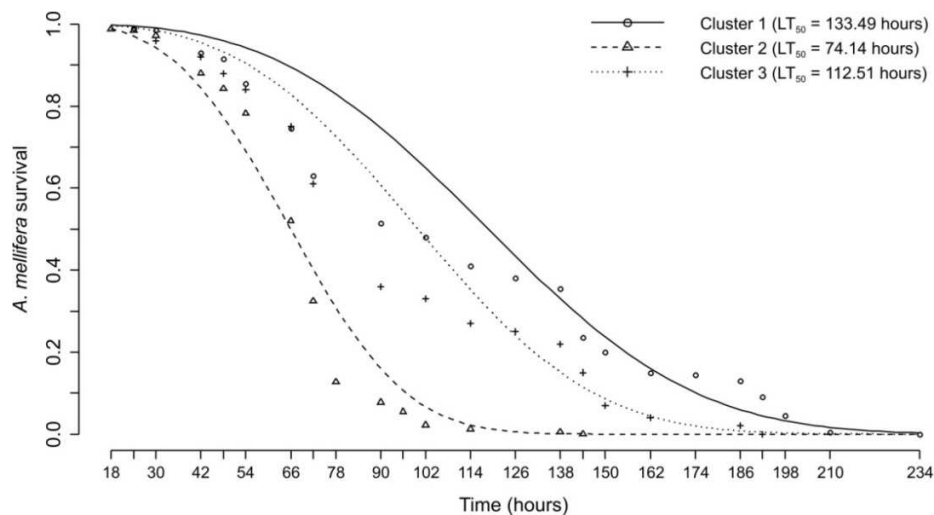


Figura 10 Sobrevivência (%) de adultos de *Apis mellifera* após o fornecimento do açúcar invertido comercial e artesanal e ambos contaminados ou com thiamethoxam submetidos à exposição crônica por ingestão em diferentes doses

Nota: Cluster 1: (controle) e (açúcar invertido artesanal); Cluster 2: (açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael), (açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael), (açúcar invertido comercial associado com thiamethoxam Loael/100) e (açúcar invertido artesanal associado com thiamethoxam Loael/100); Cluster 3: (açúcar invertido comercial), N= 700 abelhas/médias \pm DP 5 repetições. Dados submetidos à análise de contraste de modelos ($P \leq 0,05$)

5 DISCUSSÃO

A sobrevivência dos insetos logo após o fornecimento das diferentes concentrações do HMF nos ensaios crônico e agudo não causaram nenhum efeito tóxico visível para as abelhas. No entanto, com o passar do tempo, os sintomas de intoxicação começaram a ser evidentes. Esse comportamento observado pode ser devido ação citotóxica do HMF nas abelhas, em que os efeitos tóxicos não podem ser visualização em curto prazo, contudo, à medida que ocorre a absorção e a metabolização do composto no corpo do inseto, ocorrem todos os efeitos tóxicos descritos (BAILEY, 1966).

Segundo Girou (2007) a exposição das abelhas ao HMF no açúcar invertido pode reduzir a longevidade das abelhas, e nos períodos atípicos em que os insetos permanecem na colmeia, o acúmulo desse composto no intestino pode agravar sua toxicidade.

Neste estudo, os sintomas de intoxicação observados para o HMF foram dificuldade de alimentação, diarreia e prostração dos insetos no fundo da gaiola. LeBlanc et al. (2009) também constatou a toxicidade do HMF para as abelhas, mostrando que em concentrações entre 57 e 200 ppm, esse composto não afetou a sobrevivência das abelhas. No entanto, o tratamento com a concentração 250 ppm a mortalidade foi alta. Bailey (1966), além de constatar a toxicidade do HMF para as abelhas, mostrou que esse composto causa ulceração no intestino médio das abelhas o que pode resultar na disenteria e posteriormente morte dos insetos.

Os efeitos do HMF não são registrados apenas para abelhas. Sua ação citotóxica tem sido relatada para outros grupos. Bauer-Marinovic et al. (2012) trabalhando com duas linhagens de ratos observaram que após a oferta de uma dosagem de 250 mg / kg de HMF houve a mortalidade da maioria dos indivíduos entre 5-11 dias devido a danos nos túbulos proximais. Os mesmos

autores observaram que em doses inferiores, administradas repetidamente, os túbulos foram afetados, apresentando indícios de regeneração e posteriormente hiperplasia atípica. Além disso, efeitos hepatotóxicos, serosite de tecidos peritoneais e lesões no fígado, estômago, intestino, rins e baço foram observados. Glatt, Schneider e Liu (2005) mostrou que além dos efeitos citotóxicos, o HMF pode apresentar efeito genotóxico, causando a indução da trocas das cromátides irmã em ratos.

No presente estudo, a exposição oral do thiamethoxam (Loael e Loael/100) mostrou ser tóxico para os adultos de *A. mellifera*. Já nas primeiras horas após seu fornecimento provocou sinais de intoxicação, que com o passar do tempo, foi observado um acréscimo na sua toxicidade. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Kakamand, Mahmoud e Amin (2008) e Laurino et al. (2011) que relatam ainda que além dos danos direto, os efeitos das subdoses do thiamethoxam podem apresentar ação citotóxica, atuando no intestino médio das abelhas, causando vacuolização citoplasmática. Oliveira et al. (2013) observaram quem mesmo em subdoses, o thiamethoxam foi tóxico para as abelhas, que além de causar danos no cérebro, provocou uma redução do número de células regenerativas presentes no epitélio do intestino. Além disso, os autores ainda relatam que quando expostos a doses crônicas, os efeitos são mais pronunciados.

Os sintomas de intoxicação causados pelo thiamethoxam observados neste estudo, como a falta de coordenação motora, voos desordenados e prostração das abelhas, estão de acordo com os relatados por outros autores (THOMPSON, 2003; CARVALHO et al., 2009). Esses efeitos, segundo Tomizawa e Casida (2003), são característicos de produtos neonicotinoides, os quais mimetizam o neurotransmissor excitatório (acetilcolina), e competem com ele pelos seus receptores nicotinérgicos localizados na membrana pós-sináptica, o qual não é degradado pela ação da acetilcolinesterase e,

consequentemente induzindo a transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, causando colapso do sistema nervoso.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a associação do thiamethoxam com o HMF mostrou alta toxicidade para as abelhas, que aqueles obtidos quando esses foram fornecidos separados como observado nas figuras 4 e 5. Nos tratamentos em que foi utilizada a maior concentração do HMF (Loael) e a menor do thiamethoxam (Loael/100), foi observado menor TL_{50} para as abelhas, sugerindo assim um efeito sinérgico mais pronunciado. De uma maneira geral, tem sido proposto que a ação sinérgica pode ocorrer quando duas substâncias administradas concomitantemente podem causar uma resposta superior/inferior de quando essas substâncias são administradas isoladamente (METCALF, 1967; PILLING; JEPSON, 1993).

Embora o mecanismo exato envolvidos neste efeito sinérgico no presente estudo não seja claro, esses resultados sugerem que pode haver um sinergismo de potencialização. Diversos estudos demonstram uma série de mudanças provocadas no intestino médio de abelhas que foram expostos a agentes xenobióticos, ou seja, substâncias químicas, naturais ou artificiais estranhas, que possivelmente causam desequilíbrios no metabolismo de um organismo, como por exemplo, o HMF e o Thiamethoxam para abelhas (BAILEY, 1966; OLIVEIRA et al., 2013). É sabido que a região de absorção do alimento dos insetos de maneira geral é no intestino médio, e pelo fato do HMF e Thiamethoxam provocar vacuolização citoplasmática das células deste tecido, quando os mesmo foram aplicados em associação, pode ter havido um efeito mais pronunciado, causando uma redução do número de células regenerativas presentes nesta região, que são responsáveis pela reestruturação do epitélio (CRUZ-LANDIM, 2009), o que pode deixar os insetos debilitados, levando os a morte por inanição. Essa suposição pode ser evidenciada com base nos resultados encontrados neste estudo.

No presente estudo, observou-se que em função da dieta utilizada, há variação na sobrevivência dos adultos de *A. mellifera*. A maior sobrevivência foi observada quando as abelhas foram alimentadas com sacarose + H₂O (1:1) em que constatou uma média de sobrevivência de 228 horas. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com aqueles encontrados por Herbert Júnior e Shimanuki (1978) que mostraram que adultos de *A. mellifera* sobreviveram por um período maior quando alimentadas com essa dieta à base de sacarose.

Para os açúcares invertido comercial (Gludex[®]) e artesanal a sobrevivência média das abelhas foi de 207 e 216 horas respectivamente. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados Brighenti et al. (2011) observaram que a sobrevivência das abelhas após a oferta do açúcar invertido comercial (Gludex[®]) e o açúcar invertido artesanal foi de 118,4 e 209,5 horas, respectivamente.

Apesar de o açúcar invertido ser apontado como o melhor alimento alternativo de *A. mellifera* (BRIGHENTI et al., 2011), neste estudo, a dieta a base de sacarose + H₂O (1:1) mostrou ser a mais adequada para manutenção dos insetos em condições de laboratório. Esses resultados por vez podem estar relacionados ao fato dos açúcares invertidos utilizados no presente estudo possuírem traços de HMF. É conhecido, LeBlanc et al. (2009) que no processo de fabricação do açúcar invertido, pode haver a formação do HMF, podendo comprometer a qualidade do produto final. Bailey (1966) constatou após a oferta de solução de sacarose invertida para abelhas adulta, a mesma mostrou ser tóxica, causando mortalidade superior a testemunha em que a solução aquosa de sacarose 60% foi fornecida. Segundo esse autor, a causa da toxicidade das abelhas ao açúcar invertido, pode estar relacionada aos resíduos de HMF e/ou o excesso de ácido usado para conversão do açúcar, causando distúrbios fisiológicos nos adultos e redução de longevidade, como foi evidenciado por Ozcan, Arslan e Ceylan (2006).

6 CONCLUSÕES

O thiamethoxam e o HMF foram tóxicos para os adultos de *A. mellifera* independente da forma de exposição.

Quando thiamethoxam e HMF foram fornecidos em conjunto, a mortalidade foi maior do que quando ofertados isoladamente, evidenciando o possível efeito sinérgico.

A oferta de açúcares invertidos associados com thiamethoxam demonstrou ser tóxico para as abelhas.

A sobrevivência das adultas de *A. mellifera* quando alimentadas com a solução de sacarose (sacarose + H₂O) foi superior às demais dietas testadas.

REFERÊNCIAS

- ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 774-782, 2010.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 8. ed. São Paulo: Editora Andrei, 2009. 1380 p.
- ANTUNES-KENYON, S. E.; KENNEDY, G. **Thiamethoxam**: a new active ingredient review. Massachusetts: Massachusetts Pesticide Bureau, 2001. 37 p.
- BADIOU-BENETEAU, A. et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 22-31, 2012.
- BAILEY, L. The effect of acid-hydrolysed sucrose on honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 5, n. 3, p. 127-136, 1966.
- BATH, P. K.; SINGH, N. A comparison between *Helianthus annuus* & *Eucalyptus lanceolatus* honey. **Food Chemistry**, v. 67, p. 389-397, 2009.
- BAUER-MARINOVIC, M. et al. Toxicity studies with 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulphoxymethylfurfural in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulphotransferases 1A1 and 1A2. **Archives Toxicology**, v. 86, p. 701-711, 2012.
- BARKER, R. J.; LEHNER, Y. Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. **Apidologie**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 1978.
- BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 1, p. 1-20, 2012.
- BLANCHARD, P. H.; GEIGER, E. O. Production of high fructose corn syrup in the USA. **Sugar Technologic Review**, v. 11, p. 1-94, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 46 SDA / MAPA**. 2011. Disponível em: <http://www.ibd.com.br/Media/arquivo_digital/949e7fda-d8d4-45da-949d-2e923a90f4d2.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013

BREEZE, T. D. et al. Pollination services in the UK - How important are honeybees? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 142, n. 3-4, p. 137-143, Aug. 2011.

BRIGHENTI, D. M. et al. Inversão da sacarose utilizando ácido cítrico e suco de limão para preparo de dieta energética de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 297-304, 2011.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, p. 278-294, 2010.

BROMENSHENK, J. J. et al. Real-time monitoring of MPCA hazards to honeybees in a microbial containment flight chamber. In: LEVIN, M. A.; ANGLE, J. S. (Ed.). **Biotechnology risk assessment**. Maryland: USEPA/USDA/Environment. Canada/Agriculture and Agri-Food/University of Maryland Biotechnology Institute, 1996. p. 361-375.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): a review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 793-810, 2011.

CARRECK, N. L.; WILLIAMS, I. H.; LITTLE, D. J. The movement of honey bee colonies for crop pollination and honey production by beekeepers in Great Britain. **Bee World**, v. 78, n. 2, p. 67-77, 1997.

CARVALHO, S. M. et al. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 595-603, 2009.

COLIN, M.-E.; BELZUNCES, L. P. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: a convenient biological approach. **Pesticide Science**, v. 36, p. 115-119, 1992.

CORRADINI, D.; CORRADINI, C. Separation and determination of 5 - hydroxymethyl - 2 - fulfuraldehyde in fruit juices by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 503-509, 1992.

CRANE, E. **Honey**: comprehensive survey. London: W. Heinemann, 1979. 680 p.

CRUZ-LANDIM C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: UNESP, 2009. 408 p.

DANKA, R. G.; RINDERER, T. E. Africanized bees and pollination. **American Bee Journal**, v. 126, p. 680-682, 1986.

DeGRAND-IHOFFMANH, G. et al. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 4, p. 265-270, 2008.

DEJONG, D. et al. (Org.). **Bees as pollinators in Brazil**. 1. ed. Ribeirao Preto: Holos Editora, 2006. p. 63-73

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bees**. 2th repr. Oxfordshire: Oxfordshire Publishing, 2005. 344 p.

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

DOULL, K. M. Pollen supplements, III. Making effective use of supplementary feeding. **American Bee Journal**, v. 155, n. 3, p. 88-89, 1975.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1099-1105, 2008.

ESCRICHE, I. et al. Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. **Food Science and Technology International**, v. 14, p. 29-35, 2008. (Suplement, 5).

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305-313, 2004.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: E.P.U./EDUSP, 1980. 79 p.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: MMA, 2012. 112 p.

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

GLATT, H.; SCHNEIDER, H.; LIU, Y. V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. **Mutation Research**, v. 580, p. 41-52, 2005.

GLATT, H. R.; SOMMER, Y. Health risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: SKOG, K.; ALEXANDER, J. (Ed.). **Acrylamide and other health hazardous compounds in heat-treated foods**. Cambridge: Woodhead, 2006. p. 328-357.

GIROLAMI, V. et al. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 5, p. 1808-1815, 2009.

GIROU, N. G. Contaminação do mel com alimentos artificiais. **O Apicultor**, Cascais, n. 55, p. 5-8, 2007. Disponível em: <<http://www.oapicultor.com/artigos/htm>>. Acesso em: 16 dez. 2012.

GIURFA, M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. **Journal of Comparative Physiology**, v. 193, p. 801-824, 2007.

HAJJAR, R.; JARVIS, D. I.; GEMMILL-HERREN, B. The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, n. 4, p. 261-270, 2008.

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, p.143-156, 1970.

HERBERT JÚNIOR, E. W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee stored pollen. **Apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 1978.

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v. 23, p. 371-378, 2004.

JOHANSSON, T. S. K.; JOHANSSON, M. P. Feeding honeybees with pollen and substitutes. **Bee World**, v. 58, p. 105-118, 1977.

KAKAMAND, F. A. K. H.; MAHMOUD, T. T.; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Dohuk University**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

KELLER, I.; FLURI, P.; IMDORF, A. Polen nutrition and colony development in honey bees: part I. **Bee World**, v. 86, n. 1, p. 1-10, 2005.

KUSTER, B. F. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF): a review focussing on its manufacture. **Starchstarke**, v. 42, n. 8, p. 314-321, 1990.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

LAURINO, D. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 64, n. 1, p. 107-113, 2011.

LeBLANC, B. W. et al. Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7369-7376, 2009.

LEGLER, S. Alimentação artificial de abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 8., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura, 2000. p. 98-102.

MAIENFISCH, P. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 57, p. 906-913, 2001.

MALASPINA, O. et al. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. p. 1-48.

METCALF, R. L. Mode of action of insecticide synergists. **Annual Review of Entomology**, v. 12, p. 229-256, 1967.

MORALES, F. J. Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: STADLER, R. H.; LINEBACK, D. R. **Process-induced food toxicants occurrence, formation, mitigation, and health risks**. Hoboken: Stadler & Lineback, 2009. p. 144-174.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v. 12, p. 241-245, 2002.

NAUEN, R. et al. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. In: ISHAAYA, I. **Biochemical sites important in insecticide action and resistance**. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 2001. p. 77-105.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, jan. 2013. Print.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 19-22.

OZCAN, M.; ARSLAN, D.; CEYLAN, D. A. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 24-29, 2006.

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

PILLING, E. D. et al. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 51, p. 1-11, 1995.

PILLING, E. D.; JEPSON, P. C. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). **Pesticide Science**, v. 39, p. 293-297, 1993.

PRANDIN, L. et al. A scientific note on long-term stability of a home-made oxalic acid water sugar solution for controlling varroosis. **Apidologie**, n. 32, p. 451-452, 2001.

QUEIROZ, A. A.; MARTINS, J. A. S.; CUNHA, J. P. A. R. Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 8-19, 2008.

QI, X.; GUO, H.; LI, L. Efficient conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural catalyzed by sulfated zirconia in ionic liquids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, p. 7985-7989, 2011.

RAAD, R. S. **Alimentação dos enxames com uso de ração protéica seca Coapivac e líquida estimulante**. Rio de Janeiro: Coapivac, 2002. 7 p.

RIBEIRO JÚNIOR, P. J. **Introdução ao ambiente estatístico R**. UFPR. 289 p. Mini cursos. Disponível em: <<http://www.leg.ufpr.br/~paulojus/embrapa/Rembrapa/>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, n. 5, p.1-22, Jan. 2005.

RUIZ-MATUTE, A. I. et al. Carbohydrate composition of high-fructose corn syrups (HFCS) used for bee feeding: effect on honey composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7317-7322, 2010.

SERVESO, D. W.; ERICKSON, E. H. Jr. Honey Bee (Hymenoptera; Apidae) Colony Performance in Relation to Supplemental Carbohydrates. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, n. 77, p. 1473-1478, 1984.

SCHAFASCHEK, T. P. et al. Efeito da suplementação alimentar sobre as características produtivas e reprodutivas de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Biotemas**, v. 21, n. 4, p. 99-104, 2008.

SCHMUCK, R.; STADLER, T.; SCHMIDT, H-W. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). **Pest Management Science**, v. 59, p. 279-286, 2003.

SPANO, N. et al. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 310-314, 2009.

STOKSTAD, E. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. **Science**, v.335, p. 1555-1555, 2012.

SWALLOW, K. W.; LOW, N. H. Determination of honey authenticity by anion - exchange liquid chromatography . **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 695-702, 1994.

THERNEAU, T.; LUMLEY, T. **Survival analysis, including penalised likelihood**. Package version 2.36-14, 2012. 111 p.

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

THOMPSON, H. M. Interactions between pesticides: a review of reported effects and their implications for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 59-81, 1996.

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

VIDAU, C. et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011.

YONG, G.; ZHANG, Y.; YING, J. Y. Efficient catalytic system for the selective production of 5-hydroxymethylfurfural from glucose and fructose. **Angewandte Chemie**, v. 120, p. 9485-9488, 2008.

WHITE, J. W. The role of hmf and diastase assays in honey quality evaluation. **Bee World**, v.75, n. 3, p. 104-117, 1994.

WILLIAMS, I. H. The dependences of crop production within the European Union on pollination by honeybees. **Agricultural Zoology Review**, v. 6, p. 229-257, 1994.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. London: Harvard University, 1987. 281 p.

WOLFF, L. F. **Alimentação de enxames em apicultura sustentável**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. v. 63, p. 1-14. (Circular Técnica).

ZARN, J. A.; ENGELI, B. E.; SCHLATTER, J. R. Study parameters influencing NOAEL and LOAEL in toxicity feeding studies for pesticides: Exposure duration versus dose decrement, dose spacing, group size and chemical class. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 243-250, 2011.