UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAISSA BAYKER VIEIRA SILVA

O FARNESOL TÓPICO ALTERA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE OPERÁRIAS JOVENS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA*

ALFENAS/MG

2023

RAISSA BAYKER VIEIRA SILVA

O FARNESOL TÓPICO ALTERA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE OPERÁRIAS JOVENS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.
Orientador: Dr. Angel Roberto Barchuk

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Raissa Bayker Vieira .
O Farnesol Tópico Altera Parâmetros Comportamentais,Morfológicos e Moleculares de Operárias Jovens de Abelhas *Apis mellifera* / Raissa Bayker Vieira Silva. - Alfenas, MG,2023.
67 f. : il. -

Orientador(a): Angel Roberto Barchuk.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.
Bibliografia.

1. Farnesol. 2. Hormônio Juvenil. 3. Resina. 4. Abelhas. 5. Corpora allata. I. Barchuk, Angel Roberto, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

RAISSA BAYKER VIEIRA SILVA

O FARNESOL TÓPICO ALTERA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE OPERÁRIAS JOVENS DE ABELHAS APIS MELLIFERA

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: 29 de agosto de 2023.

Prof. Angel Roberto Barchuk (UNIFAL-MG)

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Isabel Ribeiro do Valle Teixeira

Instituição: Instituto Federal do Sul de Minas Gerais

IFSULDEMINAS

Profa. Dra. Marcia Maria Gentile Bitondi

Instituição: Universidade de São Paulo, RP

USP-RP

Documento assinado eletronicamente por **Angel Roberto Barchuk**, **Presidente**, em 29/08/2023, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1060497** e o código CRC **DC575B69**.

Aos meus pais, Cláudio e Marcia.
A minha irmã Radgya.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este momento para expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que me ajudaram a concluir esta etapa tão importante no meu desenvolvimento pessoal, o mestrado. Sem o apoio, incentivo e compreensão de cada um de vocês, esta conquista não seria possível. Permitam-me, então, expressar meus agradecimentos especiais:

Obrigada, Deus.

A minha querida mãe Marcia, a mulher da minha vida, meu tudo, meu pilar de força e inspiração. Sua presença sempre constante e amor incondicional me deram coragem para enfrentar cada desafio e nunca desistir. Obrigada por ser a luz que ilumina meu caminho e por acreditar em mim mesmo nos momentos de ansiedade. Me orgulho da família que tenho.

Ao meu pai Cláudio incrível, cujo apoio e sabedoria me guiaram em todos os momentos desafiadores desta jornada acadêmica. Suas palavras de encorajamento e confiança foram essenciais para me manter focada e determinada em alcançar meus objetivos, e sim "EU SOU A ESTRELA MAIS BRILHANTE DO CÉU" e sei que o senhor sempre vai "estar aí" pro que der e vier! Obrigada por tudo sempre.

À minha querida irmã Radgya, companheira de vida e cúmplice na parceria acadêmica. Cara, você sabe o quanto me orgulho, enquanto eu ralei pra terminar esta etapa você foi lá e fez 2 pós, mostrando o quanto tenho que aprender com seu esforço e competência! Seu apoio incondicional e incentivo constante foram um porto seguro em todas as fases desta jornada. Sou grata por poder contar sempre com sua presença, amor e carinho.

À minha amiga e parceira de mestrado, Gabriela Helena Barrios. Nossas discussões, colaboração e apoio mútuo foram fundamentais para enriquecer minha pesquisa e tornar essa jornada mais significativa. Agradeço por compartilhar conhecimentos e experiências que adotei para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu amigo e namorado Eduardo, que esteve ao meu lado com amor, paciência e compreensão. Seu apoio incondicional e encorajamento constante foram essenciais para superar os desafios e alcançar meus objetivos. Sou grata por todo o suporte emocional.

Ao meu orientador Angel Roberto Barchuk e aos professores que me acompanharam ao longo deste percurso: Dra. Livia Maria Rosatto Moda, Dra. Isabel Ribeiro do Valle Teixeira, Dra. Talita Sarah Mazzoni e Dr. Luiz Alberto Beijo. A orientação, conhecimento e feedback de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço por compartilharem sabedoria e inspiração, me incentivando a explorar novos horizontes acadêmicos.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, que tornou a experiência acadêmica mais enriquecedora. Agradeço a todos pelo suporte, colaboração e troca de conhecimentos que foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

À técnica Dra. Juliana Martins Ramos, pela assistência técnica e suporte valioso. Sua dedicação e competência foram fundamentais para o sucesso deste trabalho, sem sua ajuda não existiria essa pesquisa.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Adriana Pereira, que me ajudou em todas as questões burocráticas e desenvolvimento acadêmico. Também gostaria de expressar meu agradecimento à Fapemig e à CAPES, agências de fomento, pelo apoio financeiro e pelos recursos disponibilizados, que foram essenciais para o sucesso deste projeto, permitindo minha dedicação integral.

A todas as pessoas que me apoiaram mesmo permanecendo distantes geograficamente, o meu sincero agradecimento Luiz Guilherme Roots, Viviane Nassif, Ingrid Ribeiro, Flavio Oliveira Santos, Laya, Letícia Reis, Rosane Abbade, Elda Golçalves, Arlley Silva. Seja através de palavras encorajadoras, gestos de amizade ou simplesmente por estar presente em pensamento, saibam que cada gesto de apoio fez a diferença.

Por fim, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade de ter vivido em Alfenas e ter feito parte desta comunidade acadêmica, UNIFAL-MG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Desista de me fazer desistir!”
Naruto Uzumaki, 2014.

RESUMO

Os organismos vivos entram em contato diariamente com moléculas que são liberadas no meio ambiente, tanto por animais como por plantas, em uma ação conhecida como interação química ambiental. Essa interação pode, eventualmente, provocar alterações na fisiologia, morfologia e comportamento dos organismos. Algumas plantas, por exemplo, a espécie *Baccharis dracunculifolia,* conhecida popularmente como alecrim-do-campo, contém farnesol em sua resina. Este sesquiterpeno é um importante precursor da via de síntese do hormônio juvenil (HJ), substância que governa vários aspectos da vida dos insetos. Hipotetizamos que, durante o forrageamento, as operárias de abelhas *Apis mellifera* entram em contato com quantidades significativas de precursores de HJ que, uma vez dentro do corpo, podem ser modificados e convertidos em HJ. Estudos prévios de nosso grupo mostraram que operárias jovens que consomem farnesol fornecido na dieta ingerem mais alimento, são mais agressivas, possuem as glândulas *corpora allata* (CA, local de síntese de HJ) maiores, incluindo o diâmetro dos núcleos celulares, e mostram alterações nos perfis de transcrição de genes que codificam enzimas da via de síntese e degradação de HJ. Aqui fornecemos o farnesol por via tópica em operárias adultas jovens de *A. mellifera* para analisar sua influência sobre a biologia, desacoplando seu eventual efeito indireto sobre a taxa de ingestão desses insetos. Para isso, realizamos uma série de experimentos utilizando dois grupos de abelhas operárias recém emergidas (24 h): (Grupo I) 50 abelhas receberam a solução de farnesol diretamente no tórax (testamos 3 diferentes concentrações: 10 µg, 2 µg e 0,2 µg); e (Grupo II) 50 abelhas que receberam acetona (controle). As abelhas foram mantidas em estufa por 72 h, a 36º C e 80% de umidade relativa. Para avaliar os efeitos do farnesol sobre a morfologia dos CA, estes foram dissecados e processados mediante histologia em historesina, Para estimar os efeitos do farnesol sobre a via de síntese/degradação e resposta ao HJ, determinamos (usando qPCR) o nível de transcrição de genes codificadores para as enzimas *metil farnesoato epoxidase* (*mfe*) e *metiltransferase* (*mt*) *esterase do hormônio juvenil* (*jhe*), *Krüppel homólogo - Kr h1, Metoprene-Tolerant - Met* e *TAI*). Nossos resultados evidenciam que o farnesol tópico não causa alterações no consumo de alimento em abelhas jovens. No entanto, em doses altas (10 µg), se mostra tóxico, causando um aumento na mortalidade do grupo tratado. Observamos também que o farnesol tópico influencia o comportamento das abelhas jovens (aumento de movimentação), principalmente nas primeiras 48 horas após o tratamento, e promove alterações nos parâmetros morfométricos dos CA em abelhas tratadas, pois apresentam um tamanho maior (área e volume) dessas estruturas em relação ao grupo controle. As análises de níveis de transcrição mostraram que os genes *mfe* e *mt*, representantes da via de síntese do hormônio juvenil (HJ), e os genes de resposta ao HJ (*Jhe, Krüppel homólogo - Kr h1, Metoprene-Tolerant - Met* e *TAI*), foram mais expressos nos grupos tratados com farnesol em comparação com os grupos controle. Portanto, concluímos que o farnesol promove alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas em abelhas jovens de *Apis mellifera*, possivelmente, ao ser utilizado como precursor para a síntese de HJ ou mediante ação semelhante ao próprio HJ. As alterações morfológicas dos CA e as alterações nos níveis de expressão de genes da via de síntese de HJ em abelhas tratadas com farnesol apoiam a primeira explicação.

Palavras-chave: Farnesol; Hormônio Juvenil; Abelhas; Forrageamento; Resina; *corpora allata*; morfologia; transcrição gênica.

ABSTRACT

Living organisms intertwine in daily contact with calls that are released into the environment, both by animals and plants, in an action known as environmental chemical interaction. This interaction can eventually cause changes in the physiology, morphology and behavior of organisms. Some plants, for example, the species *Baccharis dracunculifolia*, popularly known as alecrim-do-campo, contain farnesol in its resin. This sesquiterpene is an important precursor of the juvenile hormone (JH) synthesis pathway, a substance that governs several aspects of insect life. We hypothesize that, during foraging, *Apis mellifera* bee workers come into contact with significant amounts of JH precursors that, once inside the body, can be modified and converted into JH. Previous studies by our group showed that young workers who consume farnesol supplied in the diet ingest more food, are more aggressive, have larger *corpora allata* (CA, site of JH synthesis) glands, including the diameter of cell nuclei, and show alterations in the transcription profiles of genes encoding enzymes in the HJ synthesis and degradation pathway. Here we provide topical farnesol in young adult workers of *A. mellifera* to analyze its influence on biology, uncoupling its possible indirect effect on the rate of ingestion of these insects. For this, we carried out a series of experiments using two groups of newly emerged worker bees (24 hours): (Group I) 50 bees received the farnesol solution directly in the thorax (we tested 3 different concentrations: 10 µg, 2 µg and 0.2 µg); and (Group II) 50 bees that received acetone (control). The bees were kept in an oven for 72 hours at 36°C and 80% relative humidity. To assess the effects of farnesol on the morphology of the AKs, they were dissected and processed through historesin histology. To estimate the effects of farnesol on the synthesis/degradation pathway and response to JH, we determined (using qPCR) the level of coding genes for the enzymes methyl farnesoate epoxidase (*mfe*), methyltransferase (*mt*), and juvenile hormone esterase (*jhe*), Krüppel homologue (*Kr h1*), Metoprene-Tolerant (*Met* and *TAI*). Our results show that topical farnesol does not change feed intake in young bees. However, at high doses (10 µg), it is toxic, causing an increase in mortality in the treated group. We also observed that topical farnesol influences the behavior of young bees (increase in movement), especially in the first 48 hours after treatment, and promotes changes in the morphometric parameters of CA in treated bees, as they have a larger size (area and volume) of these structures in relation to the control group. Transcription level analyzes showed that the mfe and mt genes, representatives of the juvenile hormone (JH) synthesis pathway, and the HJ response genes (*Jhe, homologous Krüppel - Kr h1, Metoprene-Tolerant - Met* and *TA*I), were more expressed in the farnesol-treated groups compared to the control groups. Therefore, we conclude that farnesol promotes behavioral, morphological and physiological changes in young *Apis mellifera* bees, possibly when used as a precursor for the synthesis of JH or through a similar action to JH itself. The morphological alterations of the CA and the alterations in the expression levels of genes of the HJ synthesis pathway in bees treated with farnesol support the first explanation.

Key words: Farnesol; Juveline Hormone; Bees; Foraging; Resin; *corpora allata*; morphology; gene transcription.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Títulos de hormônio juvenil (em azul) e Vitelogenina (em vermelho) em operárias 14

Figura 2 – Distribuição de Baccharis dracunculifolia nas Américas. 16

Figura 3 – Estrutura do Hormônio Juvenil III e do Farnesol.....17

Figura 4 – Fluxograma da via do mevalonato da biossíntese de HJ em insetos.....18

Figura 5 – Abelhas que consomem mais farnesol têm alterações na morfologia de seus CA e na síntese de genes da via de síntese e degradação do HJ, ocasionando mudanças no comportamento, na comunicação entre os indivíduos da colônia, no aprendizado e na capacidade de desenvolver atividades extra e intranidal.....20

Figura 6– Representação do Consumo de alimento entre os grupos controle e o grupo alimentado com dieta contendo farnesol, durante as observações comportamentais (72 h) das abelhas *Apis mellifera*. 21

Figura 7 – Fluxograma experimental:.....24

Figura 8 – Apicultor pegando um quadro de cria de *A.mellifera*; é necessário vestir-se adequadamente, usando macacão, máscara, luvas e botas. 25

Figura 9 – Quadro de madeira destinado a observação de abelhas recém emergidas.... 26

Figura 10 – Caixas de confinamento e BOD utilizada no processo de observação.....27

Figura 11– *Corpora allata* de operárias de *Apis mellifera*.....29

Figura 12 – Histologia e morfometria de corpora allata de operárias de *Apis mellifera*. 30

Figura 13 – Efeito do farnesol tópico sobre o comportamento de abelhas operárias jovens (24, 48 e 72 h) de *Apis mellifera*. 43

Figura 14– Imagens representativas de cortes histológicos em historesina de *corpora allata* localizados no trato retrocerebral de abelhas *Apis mellifera*. 45

Figura 15– Microscopia confocal das glândulas *corpora allata* de operárias de abelhas com 72 horas de vida (Gráfico 5).....47

Figura 16 – Curvas de Melting para Genes RPL32, mt, Fpps3 e Mfe.....48

Figura 17– Curvas de Melting para Genes Jhe, usp, Krüppel homólogo (Kr h1), Metoprene-Tolerant (Met) e TAI.....50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 BIOLOGIA GERAL DE ABELHAS *APIS MELLIFERA* 13

1.2 DIVISÃO DO TRABALHO, POLIETISMO ETÁRIO E ATIVIDADE DE FORRAGEAMENTO EM ABELHAS OPERÁRIAS DE *APIS MELLIFERA* 13

1.4 O FARNESOL 18

1.5 MOTIVAÇÃO E HIPÓTESE 19

1.6 OBJETIVOS 21

1.6.1 Objetivo geral 21

1.6.2 Objetivos específicos 21

2 MATERIAL E MÉTODOS 23

2.1 VISÃO GERAL 23

2.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA 25

2.3 COLMEIAS E OBTENÇÃO DE OPERÁRIAS JOVENS 25

2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE 10µg, 2µg e 0,2µg DE FARNESOL E MONTAGEM DO EXPERIMENTO 26

2.5 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS 28

2.6 DISSECÇÃO DE *CORPORA ALLATA* 28

2.7 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DE *CORPORA ALLATA* 29

2.8 PROTOCOLO DE CITOQUÍMICA COM (4′,6-Diamidino-2-fenilindol) – DAPI 31

2.9 ANÁLISE DE NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO POR qPCR 32

2.9.1 Extração de RNA total 32

2.9.2 Síntese de Cdna 33

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 35

3 RESULTADOS 37

3.1 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE O CONSUMO DE ALIMENTO E A SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS RECÉM-NASCIDAS 37

3.2 REGISTRO COMPORTAMENTAL 42

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA 44

3.6 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE SÍNTESE DE HORMÔNIO JUVENIL (*mt*, *Fpps3* e *Mfe*) EM *CORPORA ALLATA* DE ABELHAS JOVENS..... 47
3.7 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DE RESPOSTA AO HORMÔNIO JUVENIL EM *CORPORA ALLATA* DE ABELHAS JOVENS 49
4 DISCUSSÃO 52
4.1 O FARNESOL TÓPICO NÃO ALTERA O CONSUMO E EM DOSES ALTAS É TÓXICO EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA* 52
4.**2** O FARNESOL TÓPICO ALTERA O COMPORTAMENTO DE OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*.....53
4.**3** O FARNESOL TÓPICO ALTERA OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS MORFOLOGIA DOS *CORPORA ALLATA* DE OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA* 54
4.4 O FARNESOL TÓPICO ALTERA O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DA VIA DE SÍNTESE DE HORMÔNIO JUVENIL (*mt e Mfe*) EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*.....55
4.5 O FARNESOL TÓPICO ALTERA O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE RESPOSTA AO HORMÔNIO JUVENIL EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA* 56
5 CONCLUSÕES.....57
REFERÊNCIAS 58
ANEXOS 63

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA GERAL DE ABELHAS *APIS MELLIFERA*

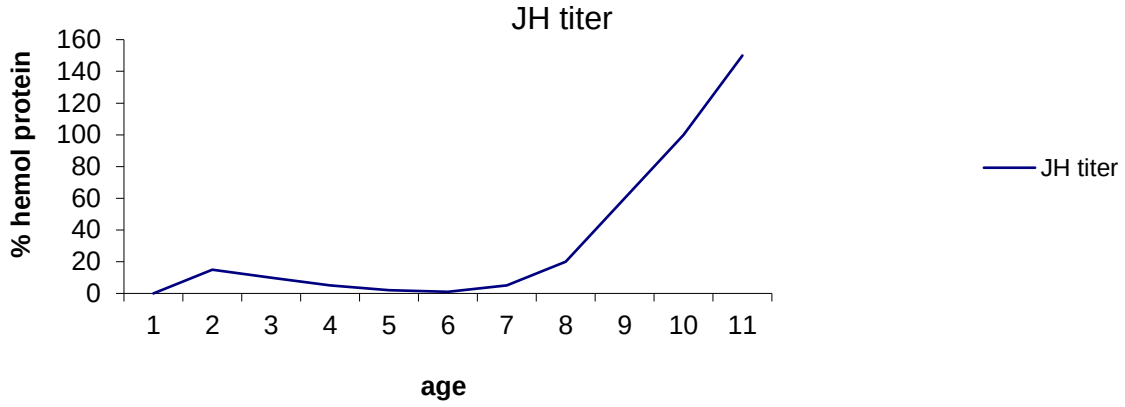
As abelhas *Apis mellifera* são insetos altamente eussociais, que vivem em colônias de aproximadamente 50.000 indivíduos (GONÇALVES; STORT 1978). Os indivíduos dessas colônias apresentam um admirável sistema de comunicação e organização dentro da colmeia. Essas são consideradas as principais responsáveis pela manutenção do ecossistema global, utilizando da polinização para auxiliar a agricultura e preservação de várias espécies florais (GRIMALDI; ENGEL, 2005). Os indivíduos de uma colônia apresentam divisão de trabalho reprodutivo, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971). A organização da colmeia é marcada pela divisão de castas, que inclui as rainhas e as operárias entre os indivíduos adultos do sexo feminino e os zangões, do sexo masculino (MICHENER, 1969). As rainhas são responsáveis pela reprodução, enquanto as operárias são responsáveis por realizar uma série de tarefas vitais para a manutenção da colônia. Dentre essas tarefas estão desde a alimentação das abelhas mais jovens até a coleta de materiais essenciais, como pólen, néctar, água e resina. Além disso, as operárias têm a importante função de proteger o ninho e construir alvéolos de cera, que serão utilizados como abrigos para as larvas em desenvolvimento, que se tornarão operárias. Já os machos, têm como principal função fecundar as rainhas (SNODGRASS, 1935).

1.2 DIVISÃO DO TRABALHO, POLIETISMO ETÁRIO E ATIVIDADE DE FORRAGEAMENTO EM ABELHAS OPERÁRIAS DE *APIS MELLIFERA*

As abelhas operárias adultas de *A. mellifera* possuem funções especializadas, como o forrageamento, que envolve a busca por alimentos e materiais para os cuidados intranidais, como pólen, néctar, água e resina. Essa atividade é influenciada pelo fluxo de entrada e saída de abelhas na colônia e é afetada pela umidade ambiental, que afeta a produção de néctar pelas plantas. A quantidade de néctar coletada indica uma maior demanda por carboidratos na colônia (SEELEY, 1995). Por outro lado, foi demonstrado que um aumento gradual nos níveis de hormônio juvenil (HJ) na hemolinfa de operárias de *A. mellifera* demonstrou ter influência no comportamento, principalmente em operárias adultas, e está diretamente relacionado com o desenvolvimento de comportamentos associados ao polietismo etário dessas abelhas (JAYCOX; SKOWRONEK; GUYNN, 1974; ROBINSON; VARGO, 1997). O polietismo etário em abelhas *A. mellifera* é um sistema em que as abelhas desempenham diferentes funções

ao longo de suas vidas, de acordo com a idade. Nos primeiros dias de vida (0-48 h), as abelhas recém emergidas se dedicam ao desenvolvimento e adquirem habilidades, como a limpeza da colônia (SEELEY, 1982). Entre o quarto e o décimo segundo dia, alimentam larvas e constroem favos. A partir do décimo quarto dia, tornam-se forrageiras, coletando recursos para a colmeia. Com o tempo, assumem funções de defesa e cuidado, encerrando seu ciclo de vida após algumas semanas, permitindo a eficiência e sobrevivência da colônia (GALEANO, 2010). O polietismo etário é responsável por explicar dois fenômenos essenciais: a fisiologia específica de cada casta e os mecanismos adaptativos que controlam as transições entre as castas. Uma hipótese geral para explicar esses dois fenômenos sugere que o mecanismo de desenvolvimento da fisiologia específica de cada casta depende de um feedback positivo, onde os fatores comportamentais e fisiológicos se reforçam mutuamente, mantendo a composição em uma fase comportamental específica (JOHNSON BR, 2009). A relação do HJ com o desenvolvimento do comportamento está ligada à mudança de função desse hormônio, que passa de regulador de processos reprodutivos para integrador da vida social (FIGURA 1) (HARTFELDER, 2000).

Figura 1 – Títulos de hormônio juvenil (em azul) e Vitelogenina (em vermelho) em operárias adultas de *Apis mellifera*.



Fonte: K. Hartfelder, 2018 (Comunicação Pessoal).

Em um estudo com abelhas adultas, foram observadas abelhas recém-emergidas em uma colônia. Alguns indivíduos coletaram pólen durante toda a vida, enquanto outros não coletaram. Houve diversidade na fase da vida em que ocorreu a coleta de pólen, independentemente da idade (RIBBANDS, 1952). Isso sugeriu que a divisão do trabalho no forrageamento não é determinada pela idade, mas sim pelos requisitos da colônia. A transmissão de alimentos é o método fundamental de comunicação na colônia. De acordo com Giannoni *et al* (2020), aproximadamente 8% das operárias coletoras de pólen e cerca de 36%

das não coletoras de pólen trabalham em turnos distintos. Essa diferença pode ser atribuída a fatores característicos entre os dois grupos. A disponibilidade de recursos ao longo do dia também pode influenciar essa discrepância. Além disso, observou-se que os indivíduos podem mudar de turno ao longo do tempo, especialmente no início da fase de forrageamento, devido a alterações epigenéticas, hormonais, de desenvolvimento ou morfológicas (GIANNONI ,2020).

Além da coleta de pólen e néctar, as abelhas desempenham um papel importante na coleta de resinas vegetais, carregando entre 5 e 15 mg de resina (SEELEY, 1995; WILSON *et al*, 2013), para produzir a própolis, uma substância com propriedades antissépticas que protege as larvas contra bactérias e fungos, além de ser usada para fechar aberturas no ninho (KUROPATNICKI, SZLISZKA, KROL, 2013). Em Minas Gerais, a planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim-do-campo, é uma das principais fontes de resina (FIGURA 2). Um estudo realizado por Lago *et al.* (2007) investigaram a composição química dos óleos essenciais de seis espécies de *Baccharis* e revelou algumas diferenças. Entre as espécies estudadas, *B. schultzii*, *B. regnelli* e *B. uncinella* alcançaram proporções elevadas de monoterpenos (34,93%, 35,79% e 21,34%, respectivamente). *B. microdonta* e *B. trimera* apresentam semelhanças de monoterpenos, com proporções de 9,23% e 7,20%, respectivamente. Por outro lado, *B. dracunculifolia* se destacou pela abundância de sesquiterpenos (63,10%, como o farnesol), juntamente com *B. regnelli* (37,76%) e *B. trimera* (53,52%). O farnesol está presente não apenas nos óleos essenciais das folhas de alecrim, mas também em sua resina (ALENCAR *et al*., 2005) e na própolis (TEIXEIRA *et al.*, 2005), e é emitido por várias plantas com flores (EL-SAYED, 2023). O alecrim-do-campo é uma das plantas visitadas por abelhas *A. mellifera*, que com sua resina produzem a tradicional própolis verde (BASTOS *et al*., 2011). Essas descobertas demostraram uma interação complexa entre as plantas e as abelhas, fornecendo informações sobre as substâncias químicas envolvidas nas relações ecológicas. Isto porque o farnesol é conhecido por ser um precursor do hormônio juvenil em insetos, hormônio que desempenha um papel importante no desenvolvimento e regulação do comportamento, incluindo as abelhas (BELLÉS; MARTÍN; PIULACHS, 2005). Assim, sua presença em *B. dracunculifoliam* sugere uma influência potencial dessa planta no desenvolvimento e comportamento das abelhas em seu ambiente natural.

Figura 2 – Distribuição de *Baccharis dracunculifolia* nas Américas.



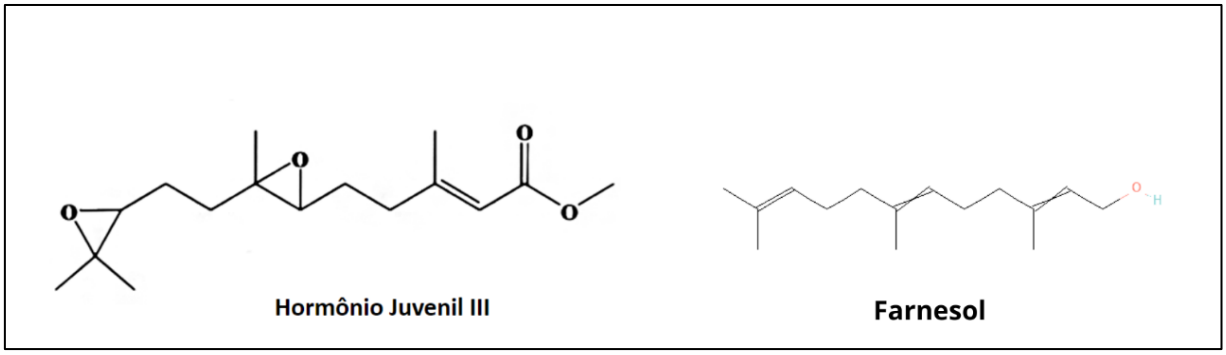
Fonte: A) VIEIRA, NK. B) ROSKOV, Y, 2011.

Legenda: Distribuição de *Baccharis dracunculifolia* subsp. *dracunculifolia:* Nativo de: Nordeste da Argentina, Noroeste da Argentina, Bolívia, Sul do Brasil, Sudeste do Brasil, Centro-Oeste do Brasil, Paraguai, Peru, Uruguai.

1.4. A VIA DE SÍNTESE DE HORMÔNIO JUVENIL

A via de síntese de HJ (FIGURA 3), conhecida também via do mevalonato (BELLÉS; MARTÍN; PIULACHS, 2005) é regulada por neurotransmissores e neuropeptídeos (GILBERT, 2005). O primeiro passo para a formação do HJ é a transformação de acetil-CoA em farnesil-pirofosfato, passo comum para vertebrados e invertebrados. Essa via de síntese é dividida em duas etapas, sendo a primeira responsável pela expressão de genes como Farnesil difosfato sintase e a etapa final, a qual o farnesil pirofosfato (FPP) é hidrolisado pelo pirofosfato em farnesol, um importante fator para alguns processos metabólicos tanto em animais quanto em vegetais e microrganismos, sendo oxidado, posteriormente, a farnesal e ácido farnesóico (FA), respectivamente (FIGURA 4) (BELLÉS; MARTÍN; PIULACHS, 2005). As etapas da via de síntese do HJ têm um papel crucial na regulação hormonal das abelhas e de outros organismos. Compreender esses processos é fundamental para entender o controle do desenvolvimento e comportamento desses insetos vitais para a polinização e a produção de alimentos.

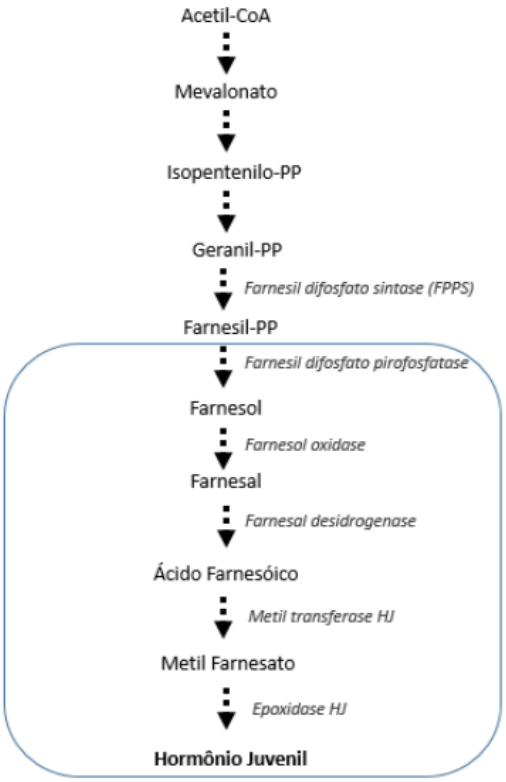
Figura 3 – Estrutura do Hormônio Juvenil III e do Farnesol.



Fonte: Newman, Morisseau e Hammock. (2005).

Figura 4 – Fluxograma da via do mevalonato da biossíntese de HJ em insetos

.



Fonte: Adaptação de Bellés, Martín e Piulachs (2005).
Legenda: Evidenciando os intermediários da cadeia, bem como as enzimas envolvidas no processo, divididas em duas etapas: a via do mevalonato etapa inicial; e a etapa final na qual farnesol pirofosfato (FPP) é hidrolisado pelo pirofosfato em farnesol, farnesol oxidado em farnesal e ácido farnesóico (FA), e, finalmente, a produção de HJ por uma epoxidase.

1.4 O FARNESOL

O farnesol é uma molécula hidrofóbica e, portanto, insolúvel em água, mas miscível com óleos. Possui o nome pela IUPAC de (2E, 6E) -3,7,11-Trimetil Dodeca-2,6,10-trien-1-mol, fórmula química C15H26O, massa molar 222,37 g/mol, densidade de 0,887g/cm3, PE de 556,15 a 557,15 K, PF <25 ° C, com um odor floral e possui uma aparência de líquido incolor, solúvel em três volumes de álcool 70% (1:3), insolúvel em água (Resumo do composto PubChem para CID 445070).

O farnesol é mais conhecido por ser um precursor da via de síntese do hormônio juvenil, e é classificado como um sesquiterpenóide farnesano dodeca-2,6,10-trieno substituído por grupos metil nas posições 3, 7 e 11 e um grupo hidroxila na posição 1. Tem um papel como metabólito vegetal e metabólito fúngico. Além disso, o farnesol possui propriedades antimicrobianas, o que significa que ele tem a capacidade de inibir o crescimento de

microorganismos, como bactérias e fungos. Essa atividade antimicrobiana pode ser explorada em diversas aplicações, como na indústria de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, na produção de alimentos e na área médica (PUBCHEM, 2004).

O farnesol está presente em todos os eucariotos, porém, sua função na fisiologia celular é pouco compreendida. Além de sua participação na síntese de esqualeno-colesterol-esteroides em vertebrados e hormônios juvenis em insetos, estudos recentes indicam que o farnesol atua como inibidor de canais de cálcio em células de mamíferos (DE LOOF *et al.,* 2015). Essa descoberta sugere um novo papel do farnesol como regulador da homeostase do cálcio em células eucarióticas, e também pode estar envolvido na proteção dos espermatozoides contra o cálcio tóxico. Esse paradigma indica que o farnesol atua como uma válvula molecular flexível para controlar o fluxo de cálcio em células específicas. Ademais, o farnesol tem relevância no sistema reprodutor masculino, possivelmente atuando como ativador da "cauda" (flagelo ou cílio ou undulipódio) e inibidor do apoptose induzido pelo cálcio nas células espermáticas durante a jornada em direção ao óvulo. A presença prévia do farnesol antes do surgimento dos animais indica que sua função como hormônio é uma característica evolutivamente tardia, adquirida posteriormente através da via do mevalonato em animais (DE LOOF A; SCHOOFS L, 2019).

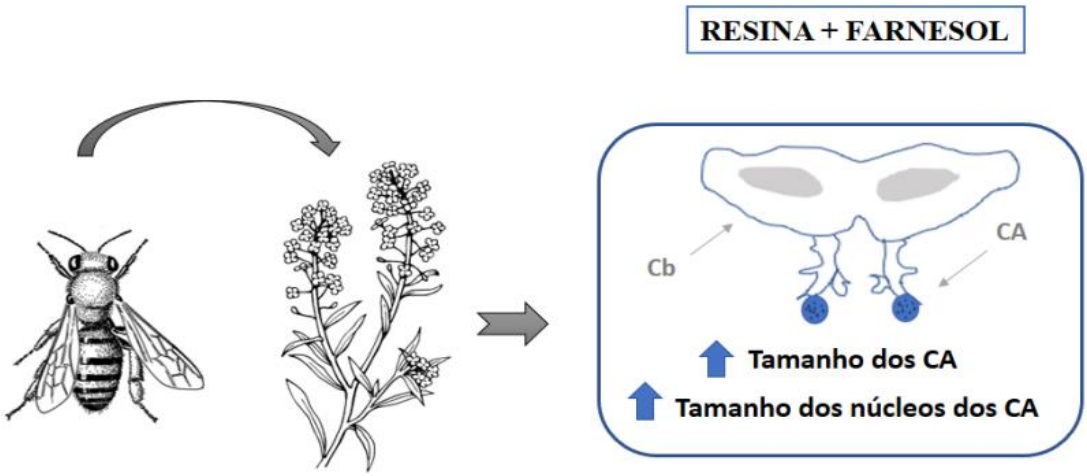
1.5 MOTIVAÇÃO E HIPÓTESE

Quando as abelhas forrageiras coletam "matéria-prima" das plantas, elas estão constantemente expostas às partículas liberadas no ambiente. Essa exposição pode ter efeitos influenciadores em sua fisiologia, morfologia e comportamento. Um exemplo importante é o farnesol, encontrado nas resinas de algumas plantas, que atua como um precursor essencial na síntese dos hormônios juvenis (HJ). Esse hormônio desempenha um papel importante na regulação da diferenciação de castas e nas mudanças de função dentro da colônia de abelhas (polietismo etário). O HJ funciona como um sinal químico, influenciando a fisiologia e o comportamento das abelhas, além de desempenhar um papel na regulação do sistema reprodutivo e nas funções dos indivíduos dentro da colônia (HARTFELDER, 2000).

Se cada abelha coleta e carrega aproximadamente 5-15 mg de resina por "viagem" (SEELEY, 1995; WILSON *et al*., 2013), hipotetizamos que durante o processo as forrageiras entrem em contato com precursores de HJ (em concentração de aproximadamente 2,95% em óleos essenciais, isómeros, Z e E, (LAGO *et al.*, 2008), que podem ser transformados e convertidos em HJ dentro de seus corpos (COELHO *et al.*, 2021). Estudos anteriores realizados

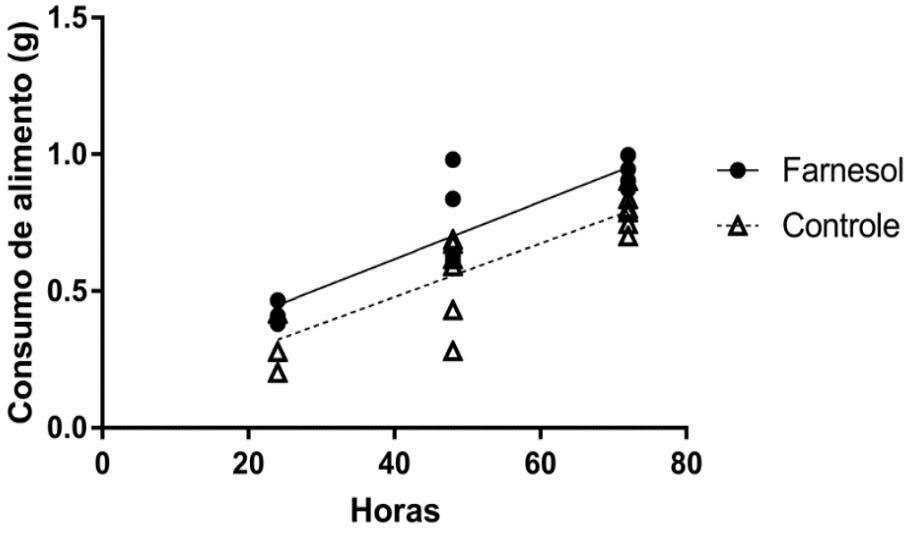
em nosso grupo observaram que as operárias jovens que consomem farnesol em sua dieta apresentam comportamento mais agressivo, glândulas *corpora allata* (CA), que são responsáveis pela síntese de HJ, maiores em tamanho, incluindo o diâmetro dos núcleos das células, e alterações nos perfis de transcrição dos genes envolvidos na síntese e degradação do HJ (FIGURA 5). Por outro lado, as operárias tratadas mostram maior taxa de ingestão de alimento (FIGURA 6).

Figura 5 – Abelhas que consomem mais farnesol têm alterações na morfologia de seus CA e na síntese de genes da via de síntese e degradação do HJ, ocasionando mudanças no comportamento, na comunicação entre os indivíduos da colônia, no aprendizado e na capacidade de desenvolver atividades extra e intranidal.



Fonte: Coelho (2020).

Figura 6– Representação do Consumo de alimento entre os grupos controle e o grupo alimentado com dieta contendo farnesol, durante as observações comportamentais (72 h) das abelhas *Apis mellifera*. Teste t $p \leq 0,01$.



Fonte: Coelho-Júnior *et al*. (2021).

Dessa forma, o aumento do consumo de alimento contendo farnesol altera o comportamento das abelhas, reforçando a hipótese de que quando uma abelha entra em contato com plantas, que possuem farnesol em suas resinas, consequentemente pode ter sua fisiologia, metabolismo e comportamento modificados, repercutindo em seu ciclo de vida e sua relação com outros indivíduos da mesma espécie, por exemplo, no desenvolvimento de atividades nas colônias (MATOS-JÚNIOR, 2018). Assim, para desacoplar os eventuais efeitos do farnesol dos efeitos do aumento do consumo de alimento sobre a fisiologia das abelhas, neste projeto avaliamos os efeitos do farnesol fornecido por via tópica.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

O presente trabalho investigou os efeitos da influência do farnesol tópico sobre a fisiologia de operárias adultas de abelhas *A. mellifera.*

1.6.2 Objetivos específicos

Nesta pesquisa, os objetivos específicos foram os seguintes:

a) Determinar uma dose não letal de farnesol para os ensaios de análise de influência sobre a biologia de abelhas operárias jovens;
b) Avaliar o comportamento de operárias jovens que foram submetidas a farnesol tópico e mantidas em confinamento;
c) Avaliar a influência do farnesol tópico sobre características morfométricas de *corpora allata* de abelhas jovens;
d) Determinar a resposta transcricional de genes codificadores de enzimas da via de síntese/degradação e de genes de resposta ao HJ após tratamento com farnesol.

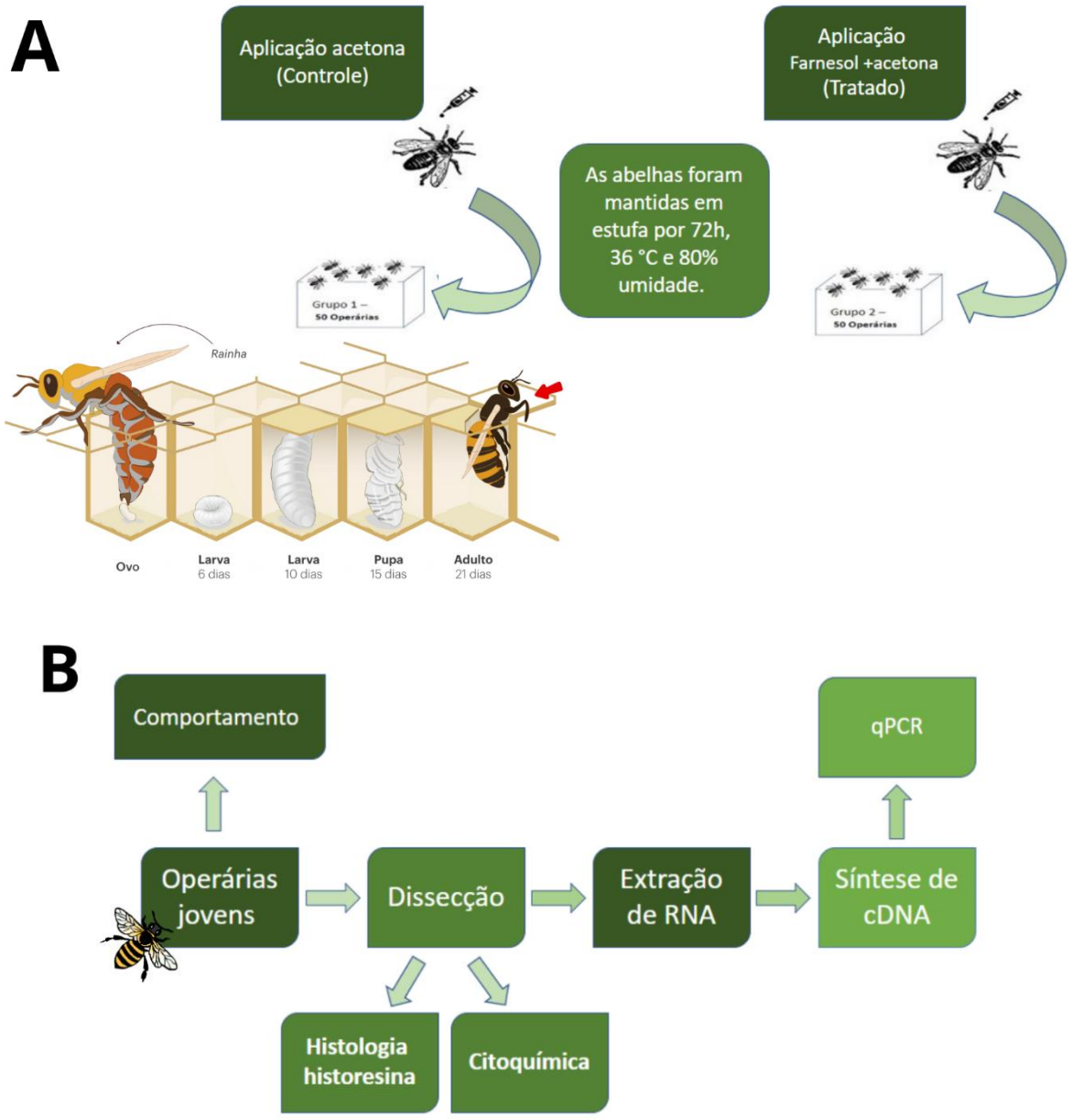
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 VISÃO GERAL

O experimento consistiu no tratamento tópico de abelhas *A. mellifera* com farnesol em diferentes concentrações: 10 µg, 2 µg e 0,2 µg por abelha. Nos experimentos, o farnesol foi fornecido topicamente a abelhas operárias adultas recém-nascidas de *A. mellifera*, e foram analisados efeitos comportamentais, morfológicos e moleculares. Foram utilizados dois grupos de abelhas recém-emergidas (24 horas): o Grupo I, com 50 abelhas que receberam soluções de farnesol aplicado diretamente no tórax, e o Grupo II, com 50 abelhas que receberam acetona como controle. As abelhas foram mantidas em estufa a 36°C e 80% de umidade relativa por 72 horas (FIGURA 7A)

O fluxograma descritivo das etapas executadas durante a pesquisa está apresentado na Figura 7B. Essas etapas incluíram a seleção de abelhas operárias jovens, análises comportamentais, dissecção dos CA, realização de histologia em historesina, análise citoquímica com DAPI, extração de RNA, síntese de cDNA e análise quantitativa em tempo real (qPCR).

Figura 7 – Fluxograma experimental:



Fonte: Elaborada pela autora.

Em nossos ensaios, adotamos a abordagem de fornecer farnesol topicamente a abelhas operárias adultas de *Apis mellifera* e analisar seus efeitos comportamentais, morfológicos e moleculares. A) Dois grupos de abelhas operárias recém-emergidas (24 horas) foram utilizados: (Grupo I) 50 abelhas que receberam soluções de farnesol aplicado diretamente no tórax; e (Grupo II) 50 abelhas que receberam acetona (controle). As abelhas foram mantidas em estufa a 36º C e 80% de umidade relativa por 72 horas. B) Fluxograma descritivo das etapas executadas durante a pesquisa, que incluíram: seleção de abelhas operárias jovens, análises comportamentais, dissecção dos CA, realização de histologia em

historesina, análise citoquímica com DAPI, extração de RNA, síntese de cDNA e análise quantitativa em tempo real (qPCR).

2.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAINT), UNIFAL-MG, Unidade Sede, e no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (LaBMI, Centro de Biologia Experimental), Unidade Educacional Santa Clara, ambos no Campus Alfenas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). O material biológico foi obtido do Apiário Experimental do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, localizado na Fazenda da Lagoa, em Alfenas, a ~10 km de distância de ambos laboratórios.

Figura 8 – Apicultor pegando um quadro de cria de *A.mellifera*; é necessário vestir-se adequadamente, usando macacão, máscara, luvas e botas.



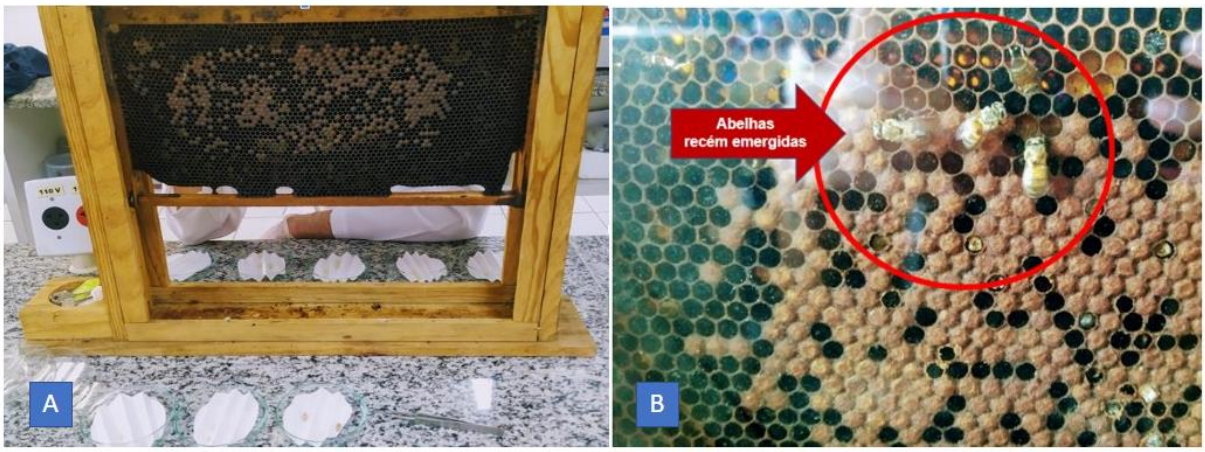
Fonte: Marcio Filho (2022).

2.3 COLMEIAS E OBTENÇÃO DE OPERÁRIAS JOVENS

Para coletar o material biológico necessário, selecionamos colônias saudáveis que apresentavam características específicas, como uma população abundante de abelhas, presença de alimento (mel e pólen) e cria (ovo, larva, pupa), além de uma ou mais crias de rainha. Ao escolher uma caixa, retiramos um quadro que precisava conter pupas "maduras" nos alvéolos (fase Pbd - pupa de olho marrom e pigmentação corporal escura). Para verificar isso, abrimos

algumas células com uma pinça ainda no apiário. Em seguida, transportamos o quadro com cuidado para evitar contaminação e ressecamento, colocando-o em uma caixa de observação feita de madeira e laterais de vidro (FIGURA 9). Em seguida, levamos a caixa para uma estufa (Incubadora Bod refrigerada - modelo Luca-161/01) com temperatura de 36º C e umidade de 80%. Monitoramos a umidade com um termo-higrômetro (Digital Externo Medidor Temperatura Umidade) e colocamos potes de plástico com água filtrada para garantir a umidade adequada. O quadro foi mantido na estufa durante as primeiras 24 horas do experimento. Após a remoção de todas as abelhas recém-nascidas e a preparação dos confinadores, o quadro foi devolvido ao apiário.

Figura 9 – Quadro de madeira destinado a observação de abelhas recém emergidas.



Fonte: Imagem da autora.
Legenda: A) Caixa onde é encaixado o quadro retirado da colmeia para observação em laboratório. Permite que os usuários retirem as abelhas adultas e coloque-as nas caixas de confinamento. B) Imagem de parte de um quadro mantido dentro de estufa, em temperatura e umidade controladas, por um período de 24 h para obtenção de abelhas recém-emergidas.

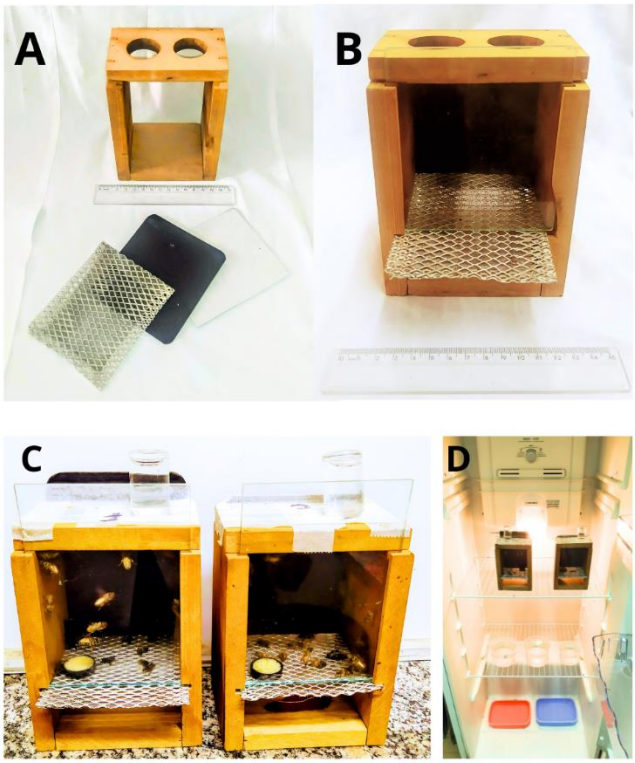
2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE 10µg, 2µg e 0,2µg DE FARNESOL E MONTAGEM DO EXPERIMENTO

As soluções de farnesol diluído em acetona foram preparadas em tubos Eppendorf, em uma caixa de isopor com gelo em escamas, para que a acetona não evaporasse rapidamente. Considerando que para preparar a solução utilizada no tratamento dos grupos de 50 abelhas, sabemos que o farnesol possui 95% de densidade e 886 µg/µL (Sigma Aldrich; catálogo: F203-5g; lote: MKBG0101V), para conseguir uma solução de trabalho de 2 µL por abelha contendo 10 µg de farnesol, utilizamos 2 µL de farnesol puro e colocamos em 200 µL de acetona. Dessa solução, aplicamos 2 µL por abelha de tal forma que cada abelha recebeu 10 µg de farnesol - quantidade não letal (GARCIA, 2023).

Oferecemos a ambos os grupos uma quantidade ilimitada de água filtrada em um recipiente de vidro de 20 mL. Além disso, fornecemos alimento na forma de uma pasta feita com uma combinação de açúcar cristalizado e mel na proporção 1:1, servida em um recipiente de plástico rígido, com formato circular e bordas definidas. O alimento foi preparado em laboratório, aproximadamente 20 minutos antes da montagem do experimento, para que esteja fresco.

Das abelhas recém-nascidas coletadas para cada experimento, foram separadas 100 (idade 0-24 h de vida adulta), das quais 50 foram colocadas numa caixa de confinamento, formando o grupo controle (C), e 50 foram colocadas em outra caixa, formando o grupo tratado com farnesol (F). Esta distribuição de abelhas em ambas caixas de confinamento foi feita ao acaso.

Figura 10 – Caixas de confinamento e BOD utilizada no processo de observação.



Fonte: Imagem da autora

Legenda: A) Caixa de confinamento para observação das abelhas, feita de madeira com volume de 800 cm³, com tela de proteção em metal e parte traseira semelhante a couro. B) Montagem das caixas de confinamento para as observações, realizadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. C) Cada caixa continha alimento em pasta (açúcar+mel) em um recipiente coberto com parafilme, além de um recipiente de plástico com água filtrada. Cada grupo experimental foi composto por 50 compostos, sendo um grupo controle e um grupo tratado com farnesol. D) Caixas de confinamento contendo abelhas da espécie *Apis mellifera* utilizadas no experimento. As caixas foram mantidas em uma estufa com umidade controlada de 80% e temperatura de 36ºC.

As abelhas do grupo controle receberam 2 µL de acetona, aplicados no tórax com uma micropipeta graduada. Um processo semelhante foi realizado com as 50 abelhas restantes, que receberam 2 µL da solução de farnesol cada uma. As abelhas, dentro de suas caixas de confinamento, foram mantidas em estufa por 72 h, a 36ºC e 80% de umidade. Durante as 72 h totais de cada experimento, as abelhas foram observadas (FIGURA 10) a cada 8 h para a identificação de qualquer alteração comportamental (COELHO JÚNIOR *et al.,* 2020). No momento da aplicação do farnesol/acetona e no momento da troca diária de alimento, o recipiente foi pesado para registrar o consumo diário das abelhas de cada unidade experimental (C e F).

2.5 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

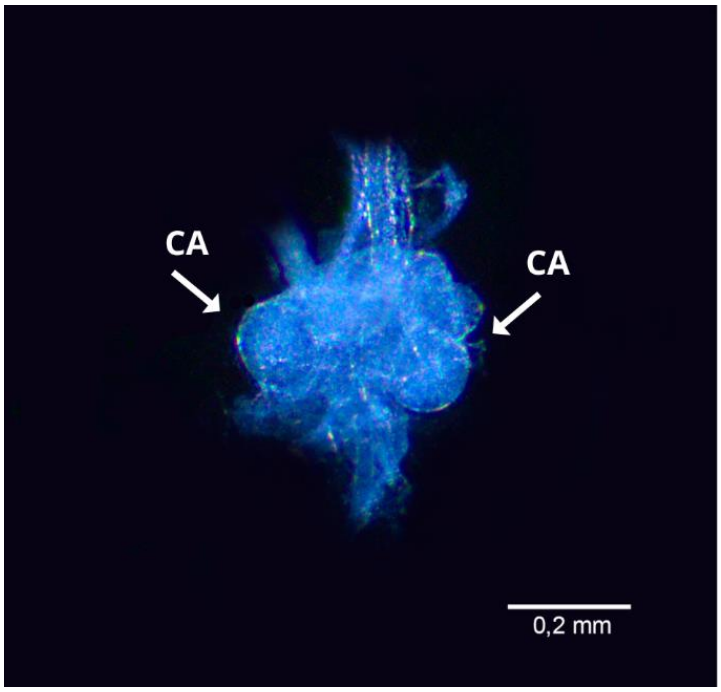
Durante as observações, foram filmados os comportamentos de agitação dentro das caixas de confinamento com um smartphone Android, com tela Touchscreen de 6.3 polegadas com resolução de 2340x1080 pixel. Após a troca de alimento e água, em uma sala apropriada para o registro, as duas caixas de confinamento, contendo o grupo 1 Grupo I (aplicação tópica de farnesol) e Grupo II (controle) foram colocadas sobre uma mesa de mármore para observação. A área interna para observação era delimitada com fita crepe branca. Isto permitiu a realização de filmagens no mesmo ângulo durante 4 minutos.

2.6 DISSECÇÃO DE *CORPORA ALLATA*

Após o período de observação de 72 horas, procedemos à dissecação dos *corpora allata* (CA) das operárias. Utilizamos pinças cirúrgicas finas e alfinetes entomológicos para manipular as estruturas de interesse, realizando a dissecação em uma placa de Petri previamente preparada com uma camada de parafina para facilitar o posicionamento e estabilização das amostras. Para obter uma visualização mais detalhada, utilizamos um estereomicroscópio Zeiss Stemi 305. Para as análises histológicas, coletamos aproximadamente 8 pares de CA por tratamento. Essas amostras foram cuidadosamente inseridas em tubos de vidro de 20 mL contendo uma solução de fixador de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para as análises moleculares, foram colocados 15 pares de *corpora allata* em microtubos Eppendorf de 1,5 µL (4 microtubos, totalizando 120 CA por tratamento). Em cada tubo, adicionamos 100 µL do reagente TRIzol® (Lote: 391501, REF: 15596026)), garantindo a preservação adequada das amostras. Os tubos foram armazenados em freezer a uma temperatura de -80ºC. O congelamento das amostras é

uma etapa utilizada para evitar a degradação do material e garantir resultados precisos durante a extração do RNA. Para as análises citoquímicas com DAPI, foram dissecados 8 pares de *corpora allata* e colocados em tubo falcon de 50 mL, com 25 mL de solução de fixação (N-Heptano/formaldeído 37%).

Figura 11– Corpora allata de operárias de *Apis mellifera*.



Fonte: Imagem da autora.

2.7 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DE *CORPORA ALLATA*

Os oito pares de CA dissecados de abelhas operárias com 72 h de vida, de cada tratamento (controle e farnesol), foram fixados e processados para observação microscópica. A etapa de fixação é a base para uma boa preparação histológica, para tanto devemos obedecer a alguns requisitos. Esta etapa consiste na utilização de substâncias que interrompam o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, mantendo, assim, a arquitetura normal do tecido. Além disso, os fixadores também fornecem maior resistência ao tecido para suportar as demais etapas.

O processamento do material, até a obtenção de blocos para corte, seguiu o protocolo a seguir:

1ª etapa: Depois de dissecados, os CA foram mantidos no fixador (Karnovsky) por no mínimo 24 h em tubo de vidro transparente (20 mL) com tampa.

2ª etapa: Após esse período para a fixação do material, foi realizada a desidratação das amostras. Os CA passaram por uma bateria de álcool de concentrações: 70%, 80%, 90% e 95%, sendo que cada troca de álcool foi feita de 15 em 15 minutos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

3ª etapa: Após a desidratação dos CA, esses foram colocados em solução de pré infiltração contendo resina + álcool, e deixados imersos 24 h (*overnight*) (os frascos foram armazenados na geladeira a 4ºC. Posteriormente, os CA foram colocados em resina de infiltração e armazenados novamente na geladeira por 2 dias, até a etapa de inclusão.

4ª etapa: Na etapa de inclusão, os CA foram transferidos para histomoldes (Cat: 14702218311) com uma solução de resina de inclusão + endurecedor (Leica Historesin®). Em seguida os histomoldes ficaram armazenados na estufa de resina (Lote: 010126) por 24 h, temperatura de 56ºC, para uma polimerização mais efetiva do material, e no dia seguinte as resinas foram retiradas da forma e coladas em bloquinhos de madeira com supercola adesiva instantânea (SUPER BONDER® LOCTITE®) (FIGURA 12).

Figura 12 – Histologia e morfometria de *corpora allata* de operárias de *Apis mellifera.*



Fonte: Imagem da autora.

Legenda: A) Formas de emblocamento contendo resina e três unidade de CA em cada poço. B) Amostras desenformadas e coladas em blocos de sustentação de madeira com supercola adesiva instantânea para que o material seja devidamente corado e cortado em micrótomo. C) Material cortado em micrótomo (Leica RM 2135), corado com Hematoxilina-Eosina e visualizado em microscópio (entre os CA tem-se parte do esôfago). As setas azuis indicam os CA

Os cortes (4 µm de espessura) foram seriados e feitos com uma navalha de vidro utilizando um micrótomo Leica RM 2135. Após fixar os cortes histológicos, em média 12 cortes em cada lâmina, foi feita a coloração do material. Para isso, utilizamos a combinação corante Hematoxilina-Eosina, que foi depositado sobre o corte fixado na lâmina com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A quantidade usada foi a necessária para cobrir o material. Depois disso,

deixamos agir a solução corante por 5 minutos e lavamos com água corrente abundante para retirar todo o excesso do corante da lâmina. Por fim, secamos a lâmina com um papel toalha, adicionamos lamínulas e as deixamos prontas (em suportes de madeira, para a secagem).

As imagens dos cortes seriados foram capturadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com uma câmera integrada ao Software Nis-Elements 3.1. Usando o microscópio, foi realizada a calibração da escala em 50 μm, o que permitiu fazer a captura das imagens com padrão de medida estabelecido. Em seguida, as imagens foram transferidas para o software de análise de imagem, o ImageJ ([1](https://imagej.nih.gov/ij/download.html). As ferramentas de seleção, como círculo e laço, foram usadas para delimitar com precisão a área de interesse. Com as medidas anotadas em uma planilha de Excel, foi possível efetuar o cálculo da área dos CA. Foram somadas as áreas de 6 pares de CA de cada tratamento, presentes nos cortes seriados, das lâminas coradas com Hematoxilina- Eosina. Para determinar o volume total aproximado do CA de cada indivíduo, foi feita a medição da área de todos os cortes histológicos e, em seguida, multiplicados pela espessura de cada corte, que foi a de 4 μm. Somamos todos os valores obtidos no passo anterior para obter a soma total das áreas multiplicadas pela espessura. O volume foi estimado em nanolitros (nL).

O volume dos núcleos de 3 pares de CA foi obtido através da análise de imagem de microscopia confocal no software ImageJ. As imagens foram carregadas no programa, a escala foi delimitada para que houvesse um padrão de referência a ser seguido. Em seguida, foi feito o ajuste do brilho e contraste para melhor visualização das estruturas. Usando ferramentas de segmentação, as áreas de interesse foram selecionadas. Após serem selecionadas, a ferramenta "Analisar Partículas" foi ativada, e posteriormente a ferramenta "Nucleus Counter" foi utilizada para selecionar todos os núcleos do CA e os dados exportados para planilha de Excel. Os valores exportados foram analisados e em seguida calculadas as médias. A eventual diferença de tamanho entre os grupos foi determinada usando o teste t de Student.

2.8 PROTOCOLO DE CITOQUÍMICA COM (4′,6-Diamidino-2-fenilindol) – DAPI

O protocolo utilizado para esta etapa foi adaptado de Ashburner (2000), com algumas modificações. Após a dissecção, as amostras de CA foram fixadas em uma solução de N-Heptano/formaldeído 37% na proporção 1:1, por 24 horas a 4ºC. Para a elaboração da solução de fixação (N-heptano com formaldeído), foi preparada uma solução de 25 mL de N-heptano e 25 mL de formaldeído 37% em um tubo Falcon de 50 mL. O tubo foi agitado vigorosamente

[1] https://imagej.nih.gov/ij/download.html

por 20 segundos e protegido da luz. A solução foi deixada em repouso por 24 horas e, quando utilizada, apenas a fase superior foi utilizada, onde o fixador estava misturado.

Após a fixação, os CA foram lavados com PBST 0,5% (PBS com Triton X-100) e incubados com uma solução de DAPI na proporção de 1:2000, diluída em PBST, durante 4 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas com PBST e montadas em lâminas utilizando glicerol 80%. As lâminas foram analisadas em um microscópio confocal (Leica TCS SP, Modelo TCS SP5 AOBS – Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) - FMRP/USP - CESM FMRP-USP) com aumento óptico de 20x.

Para a preparação do PBS 10x pH 7,4 (solução estoque), foram utilizados os seguintes compostos: NaCl (13 mM), Na2HPO4·2H2O (70 mM), NaH2PO4·H2O (3 mM). Para a preparação do PBT 0,5%, foram utilizados os seguintes componentes: PBS 1X (50 mL) e Triton X-100 (250 µL). As soluções foram preparadas um dia antes da utilização em um tubo Falcon de 50 mL, agitando suavemente para garantir a diluição adequada do detergente Triton X-100.

2.9. ANÁLISE DE NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO POR qPCR

2.9.1 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total dos CA das abelhas operárias jovens foi utilizado o reagente TRIzol® (Lote: 391501, REF: 15596026), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas manualmente com um mixer adaptado, utilizado para macerar todo material. Após este processo foi adicionado TRIzol até completar um volume total de 1000 µL do reagente. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e agitados manualmente por cerca de 15 segundos. Após três minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 15 minutos a 4ºC, o que permitiu a formação de três fases distintas: uma fase avermelhada (proteína), uma fase aquosa (RNA) e uma fase protegida (MORGANTE, *et al* 2016). A fase aquosa contendo o RNA, foi transferida para novos tubos, e para melhorar a precipitação do RNA, adicionou-se 0,2 µL de glicogênio (8 mg/mL) em cada amostra. Em seguida, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico e as amostras foram agitadas. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos a 4ºC, o que resultou na formação de pellets contendo RNA. O sobrenadante foi removido e o RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75%. Após a segunda lavagem, o material foi centrifugado a 7500 g, por 5 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o microtubo contendo o RNA foi

colocado em um termo bloco (Banho Seco – Cienlab Dry-Block) a 55ºC, por 10 minutos, para secagem. O RNA foi dissolvido em 10 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato - reagente químico que é usado para degradar RNases e evitar a degradação de ácidos nucleicos).

Após a extração do RNA total das amostras, uma pequena quantidade (1,5 µL) dessa solução foi utilizada para realizar a quantificação do RNA. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Scientific™. O comprimento de onda utilizado foi de 260 nm, correspondente à absorbância do RNA. A leitura obtida foi de 40 µg/ml, indicando a concentração de RNA presente nas amostras. Além disso, verificou-se a razão entre as leituras de 260 nm e 280 nm, que deve estar entre 1,9 e 2,0. Essa razão indica a pureza do RNA, ou seja, a ausência de possíveis contaminantes no RNA, que incluem proteínas, DNA, carboidratos e resíduos de solventes, que poderiam interferir nas análises subsequentes.

2.9.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA de cada amostra, foi utilizado 0,5 µg de RNA total dissolvido em quantidade necessária de água em DEPC, até completar o volume de 7 µL por tubo. Todas as amostras de RNA (+1) receberam 1 µL de DNase livre de RNase (Kit GoScript: Promega; lote: 0000303560, código: A5001), 1 µL de Buffer. As amostras foram deixadas em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems), por 30 minutos a 37ºC. Seguidamente, foi adicionado 1 µL de Stop Solution em cada amostra, e estas foram incubadas em termobloco, por 10 minutos a 65ºC. O tratamento das amostras com DNase permite remover ou degradar o DNA que pode estar presente juntamente com o RNA, evitando que ele cause contaminação e interfira nos resultados das análises posteriores. Seguidamente, foi adicionado 1 µL do primer oligo(dT)15 em cada amostra. As amostras foram aquecidas no Termociclador (Applied Biosystems, Veriti 96 well – Thermal Cycler) por 5 minutos, a 70ºC. Em um outro microtubo foram colocados 4 µL de Buffer 5x, 3 µL de 1 µL de DNTP mix, 1 µL de Transcriptase Reverse. O conteúdo da reação com transcriptase reversa foi colocado no primeiro tubo, contendo o RNA e o oligo(dT). As amostras foram então incubadas em um termociclador a 25ºC por 5 minutos para permitir o anelamento do primer ao RNA. Em seguida, ocorreu uma etapa de incubação a 42ºC por 50 minutos, onde a enzima Transcriptase Reversa sintetiza o cDNA complementar ao molde de RNA. Para finalizar a reação, as amostras foram incubadas no termociclador a 70ºC por 15 minutos, visando inativar a enzima Transcriptase Reverse e concluir a síntese de cDNA. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a 4ºC. As sequências dos primers correspondentes aos genes de interesse foram obtidas a partir dos

estudos de Bomtorim *et al*. (2014) e Coelho Júnior (2019). Os primers (TABELA 1) foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies - IDT®.

Tabela 1 – Primers foward (F) e reverse (R) utilizados nos experimentos da qPCR. Tº temperatura de amplificação.

Nome do primer	Sequência		Amplicon (pb)	Tº
	Primer F	Primer R		
fpps3	5' - GGGAAGACGAAGATCAATATCAC- 3'	5' - CATGCGACGAAATCAACCAAC- 3	175	60
Mt	5' - CCTTCACTGGTGCCAAAACT - 3'	5’ - TGGCCTATATCGAGGATTCG- 3’	140	60
Mfe	5’ - GGAATCATTTCTTGCGGAGA - 3’	5’- GTTATGCGCGCTATGGAAAT - 3’	145	60
RPL32	5'- CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3'	5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'	156	60
Krüppel homólogo (Kr h1)	5'GGAAAAACCATATACTTGCGACA 3’	5' TCCATTGTTTTCTTTGAACCAA 3'	144	60
Metoprene-Tolerant (Met)	5' GGAGAACCCATTTATCTACG 3'	5' TTGTATTATGGCTCTCATGG 3'	140	60
Jhe	5' GTTATCGCTTCTGATATGGCT 3'	5' GATGGGAAATAGGTACCGAC 3'	121	60
Usp	5' CGATATTCGACCGTGTCCTC 3'	5' AGCAGGGTCACTTCCTGGAT 3'	181	60
TAI	5'TGAGAAGAGCGATCGTTGGG 3'	5'ATCGCTAACCACAGCCTCAC 3'	161	60

Fonte: Elaborada pela autora

2.9.3 Ensaios de qPCR em tempo real

Para a As análises dos níveis de transcrição dos genes *mfe, mt, jhe, fpps3, Jhe, usp, Krüppel homólogo (Kr-h1), Metoprene-Tolerant (Met)* e *TAI*, utilizamos ensaio de PCR em tempo real. O desenho da placa foi realizado com 96 poços, cada coluna foi representada por

uma letra (A-H), e cada linha recebeu um número (1-12). Os genes a serem analisados foram distribuídos nas colunas da placa. Para cada gene analisado, foram utilizadas três amostras biológicas (f1, f2 e f3), além de uma duplicata técnica. Os reagentes foram preparados em cada poço da placa da seguinte maneira: SYBR® Green Real Time PCR Master Mix (Applied Biosystems™, catálogo: 1706036; REF: A25742) 5 µl, H2O de injeção (água estéril): 3,2 µl, Primer Forward (F): 0,4 µl, Primer Reverse (R): 0,4 µl, O volume total de reagentes em cada poço foi de 9 µl. Após o preparo dos reagentes, 0,5 µl de cDNA foi adicionado em cada poço da placa. Ponteiras novas foram usadas para cada poço para evitar contaminação cruzada. A placa foi vedada com adesivo colante para evitar evaporação e contaminação durante a reação. Em seguida, a placa vedada foi centrifugada a 2000 xg por 5 minutos, a uma temperatura ambiente de 20 °C, para garantir a homogeneização adequada dos reagentes no fundo dos poços.

O software do QuantStudio 3 Real-Time PCR System foi configurado corretamente para a PCR em tempo real. A placa foi configurada como "96-Well 0.2-mL", modo de execução escolhido foi "Standard", e o tipo de experimento selecionado foi "TC comparativo (ΔΔCT)". A reação foi programada com os seguintes ciclos: Um ciclo de desnaturação inicial de 2 minutos a 50 °C, segundo ciclo de desnaturação de 10 minutos a 95 °C, quarenta ciclos de amplificação, com as seguintes etapas em cada ciclo: 15 segundos a 95 °C, 1 hora a 60 °C para análise de anelamento e extensão dos primers ao alvo, 1 segundo a 95 °C para leitura da fluorescência e detecção de amplificação.

Após a realização dos ensaios de PCR em tempo real (qPCR), procedemos à análise da expressão gênica utilizando o método comparativo de ΔΔCt. Cada tratamento foi replicado em triplicata técnica, e os valores de Ct das amostras foram determinados e utilizados para calcular a média. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito, ou seja, um valor de Ct menor indica uma maior expressão do gene de interesse (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A partir da diferença de Ct de cada gene em relação ao gene constitutivo *RPL32*, os valores de ΔCt foram convertidos em 2^−ΔΔCt para a realização de testes estatísticos. Além disso, esses valores foram utilizados para a construção de gráficos, que auxiliam na visualização e interpretação dos dados obtidos.

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparar os níveis de consumo entre os grupos controle e tratado, utilizamos o método não paramétrico de Friedman, recomendado para analisar três ou mais situações experimentais com correlacionando os indivíduos ao longo do processo experimental e com um

número pequeno de amostras. Além disso, utilizamos a análise de variância em parcelas subdivididas para considerar o consumo por abelha. Para avaliar possíveis diferenças dos (CA) entre as abelhas dos dois grupos, realizamos um teste t. Para avaliar eventuais diferenças nos níveis de transcrição gênica, utilizamos a metodologia de ΔΔCt comparativo com teste t de Student. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022). Em todas as análises, adotamos um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) para a rejeição da hipótese nula.

3 RESULTADOS

3.1 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE O CONSUMO DE ALIMENTO E A SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS RECÉM-NASCIDAS

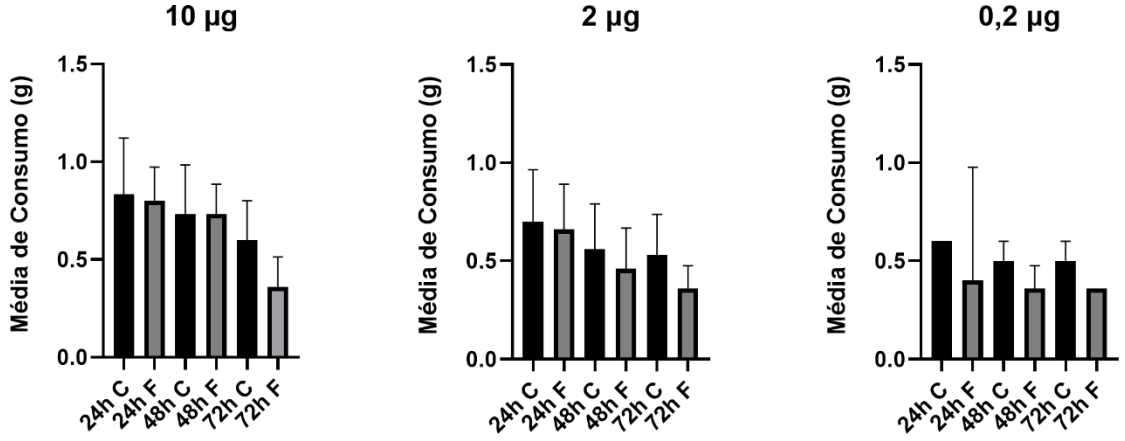
Os resultados relativos ao consumo das abelhas no ensaio em que receberam 10 µg de farnesol são apresentados no gráfico 1A. É possível observar que, às 24 horas de tratamento, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado consumiram quase a totalidade do alimento oferecido na caixa de confinamento, com o grupo controle consumindo 0,83 g DP de 0,2886751 e o grupo tratado 0,8 g com DP de 0,1732051. Isso sugere que, nesse período inicial, o farnesol não afetou significativamente o consumo de alimento pelas abelhas. Após 48 horas de tratamento, as abelhas de ambos os grupos ingeriram uma média de 0,7 g da dieta oferecida com DP de 0,2516611 no grupo controle e DP de 0,1527525 no grupo tratado. No entanto, somente após 72 horas de tratamento foi observada uma diferença significativa no consumo entre os grupos. O grupo controle consumiu uma média de 0,6 g de dieta total, com DP de 0,2, enquanto o grupo tratou com farnesol consumiu 0,36 g com DP de DP de 0,1527525. Esses resultados foram obtidos a partir de três réplicas experimentais (n = 3), o que reforça a validade dos achados.

As abelhas que receberam 2 µg de farnesol não mostraram maior consumo da dieta oferecida em nenhum dos tempos testados (GRÁFICO 1- B e TABELA 2, ANEXO C). Às 24 horas de tratamento, a média de consumo foi de 0,7 g no grupo controle com DP de 0,264575131 e 0,6 g no grupo tratado com DP de DP 0,230940108, indicando uma pequena diferença no consumo total de alimento, porém, não significativa estatisticamente. Após 48 horas de tratamento, a média de consumo foi de 0,5 g no grupo controle com DP de 0,230940108 e 0,4 g no grupo tratado, com DP de 0,2081666. Novamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao consumo total de alimento. Após 72 horas de tratamento, as médias de consumo foram de 0,5 g no grupo controle e DP de 0,2081666 e 0,3 g no grupo tratado com DP de 0,115470054. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas, indicando uma vez mais que o farnesol não teve um impacto relevante no consumo total de alimento pelas abelhas.

Os resultados dos ensaios utilizando 0,2 µg de farnesol por abelha também mostram uma semelhança nas médias de consumo entre os grupos controle e tratados. Às 24 horas de tratamento, o grupo controle apresentou uma média de consumo de 0,6 g de dieta com DP igual a 0, enquanto o grupo registrou uma média de 0,4 g com DP 0, 057735027. Essa diferença não

foi estatisticamente significativa. Após 48 horas de tratamento, o grupo controle teve uma média de consumo de 0,5 g de dieta com DP 0,1, enquanto o grupo tratado apresentou uma média de 0,36 g com DP também de 0,115470054. Essas diferenças também não foram estatisticamente significativas. Nos registros de 72 horas, porém, as médias de consumo foram de 0,5 g no grupo controle com DP 0,1 e 0,3 g no grupo tratado com DP igual a 0. Novamente, não tiveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação ao consumo total de alimentos (GRÁFICO 1 – C). Os ensaios com 0,2 µg de farnesol revelaram diferenças nas médias de consumo entre os grupos controle e tratado, porém não foram diferenças estatísticas relacionadas ao tempo ou à interação entre tempo e tipo de tratamento. A dosagem de farnesol utilizada não parece ter exercido um efeito significativo no consumo de alimento pelas abelhas durante o período de avaliação.

Gráfico 1– Consumo de abelhas operárias *Apis mellifera* recém-nascidas mantidas em confinamento e tratadas com dieta (açúcar+mel – 1 g) a cada 24 h, totalizando observações de 72 h do grupo controle (acetona) e do grupo tratado com farnesol.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A) Consumo registrado no grupo controle e grupo tratado com 10 µg de Farnesol, B) Consumo registrado no grupo controle e grupo tratado com 2 µg de Farnesol. C) Consumo registrado no grupo controle e grupo tratado com 0,2 µg de Farnesol. São apresentadas médias e desvio padrão de 3 replicatas técnicas para cada tratamento. Elaborado com GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022).

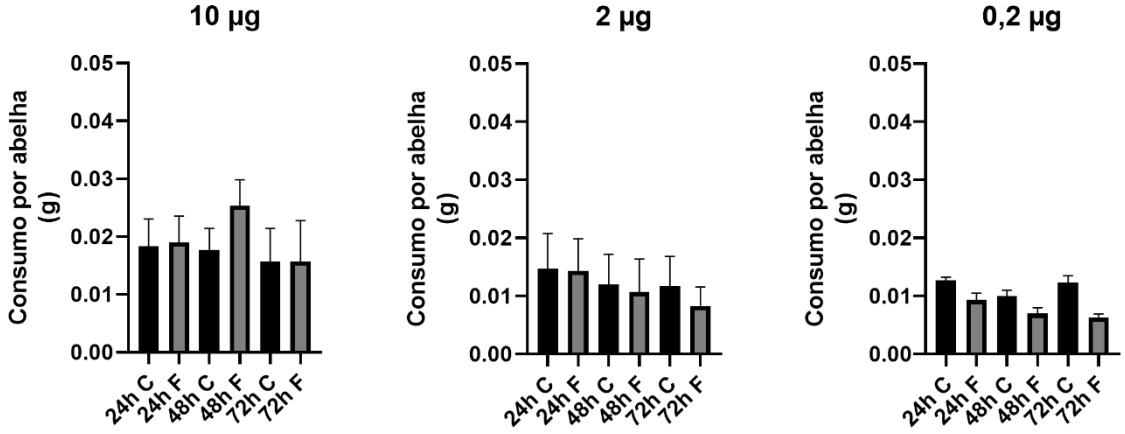
Como o consumo por tratamento é influenciado pelo número de indivíduos, e estes podem variar em caso de toxicidade do composto testado, calculamos seguidamente o consumo por abelha. A análise de teste T Student dos grupos foi realizada para investigar o consumo por abelhas em diferentes grupos examinados a testes com diferentes dosagens de farnesol. Os resultados obtidos foram apreciados no gráfico 2.

No grupo testado com 10 μg de farnesol, durante as primeiras 24 horas, observou-se que o grupo controle consumiu 0,018 g de alimento por abelha com DP de 0,0055075705 e o grupo tratado 0,019 g por abelha com DP de 0,004582575695. Isso indica que o farnesol não teve uma influência significativa no consumo individual nesse período. Após 48 horas, no grupo de testado com 10 μg de farnesol, o consumo por abelha foi de 0,017 g no grupo controle com DP de 0,003785938897 e 0,025 g no grupo tratado com DP de 0,004509249753. Nesse ponto, não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação ao consumo de alimentos por abelha. Após 72 horas de tratamento com 10 μg de farnesol, o consumo por abelha foi de aproximadamente 0,015 g no grupo controle com DP de 0,005773502692 e 0,015 g no grupo tratado com DP de 0,007094598885 (GRÁFICO 2- A). O teste Tukey indicou que essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), sugerindo que a aplicação tópica de 10 μg de farnesol não aumentou o consumo de alimento pelas abelhas recém-nascidas.

Quando testamos 2 μg de farnesol (GRÁFICO 2- B), observou-se que durante as primeiras 24 horas, a média de consumo por abelha foi de 0,014 g em ambos os grupos, o grupo controle apresentou DP de 0,006110100927 e o grupo controle DP de 0,005507570547. Após 48 horas, a média de consumo por abelha foi de 0,012 g no grupo controle e no grupo tratado 0,010. Após 72 horas de tratamento, o consumo por abelha também foi de 0,011 g no grupo controle com DP de 0,005196152423 e no grupo tratado 0,008, com DP de 0,005686240703. Este resultado reforça que não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao consumo individual. O farnesol aplicado nessa dosagem não parece ter influenciado significativamente o consumo de alimento pelas abelhas durante o período de avaliação.

Quando testamos 0,2 μg de farnesol, observamos que a média de consumo por abelha foi de 0,012 g no grupo controle, com DP de 0,006110100927e no grupo tratado 0,009 e DP 0,005507570547 nas primeiras 24 horas, sem diferença estatisticamente relevante. Essa similaridade no consumo individual entre os grupos foi mantida após 48 horas, quando as médias foram de 0,01 g no grupo controle com DP de 0,005196152423 e 0,007 no grupo tratado com farnesol com DP de 0,005686240703. Ao final das 72 horas, as médias foram de 0,012 no grupo controle com DP de 0,005131601439 e 0,006 no grupo tratado, com DP de 0,003214550254 (GRÁFICO 2 -C). Os resultados indicam que o farnesol não aumenta o consumo das abelhas recém-nascidas em nenhuma das doses testadas.

Gráfico 2 – Consumo (g) por abelha *Apis mellifera* recém-nascidas mantidas em confinamento e tratadas com dieta (açúcar+mel – 1 g) a cada 24 h, totalizando observações de 72 h do grupo controle (acetona) e do grupo tratado com farnesol.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A) Consumo registrado no grupo controle e grupo tratado com 10 µg de Farnesol, B) Consumo observado no grupo controle e grupo tratado com 2 µg de Farnesol. C) Consumo observado no grupo controle e grupo tratado com 0,2 µg de Farnesol. São apresentadas médias e desvio padrão de 3 replicatas técnicas para cada tratamento. Elaborado com GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022).

A análise do número de mortes diárias de abelhas nos grupos controle e tratados com farnesol é um importante aspecto a ser considerado no experimento. Quando testamos 10 µg de farnesol, às 24 horas, no grupo controle, registramos uma média de 6,3 indivíduos mortos com DP 4,163331999, enquanto no grupo tratado com farnesol a média foi de 9 indivíduos mortos com DP de 2 (GRÁFICO 3A). Isso sugere um aumento na mortalidade no grupo tratado em comparação ao grupo controle nesse período. Após 48 horas, a média de mortes no grupo controle foi de 3,6 indivíduos, com DP de DP 2,081665999, enquanto no grupo tratado a média foi de 12 indivíduos, com de DP 5,567764363. Essa diferença indica um maior impacto na mortalidade das abelhas no grupo tratado com farnesol (Teste Tukey, > 0,05).

Às 72 horas, a média de mortes no grupo controle foi de apenas 1,6 indivíduos DP de 0,577350269, enquanto no grupo tratado com farnesol a média foi de 5,6 indivíduos com DP de 0,577350269 também. Esses resultados também sugerem que a aplicação tópica de farnesol nessa concentração aumenta a mortalidade das abelhas jovens. Estes resultados são relevantes e indicam que o farnesol tópico na concentração de 10 µg está associado a um aumento na mortalidade das abelhas jovens.

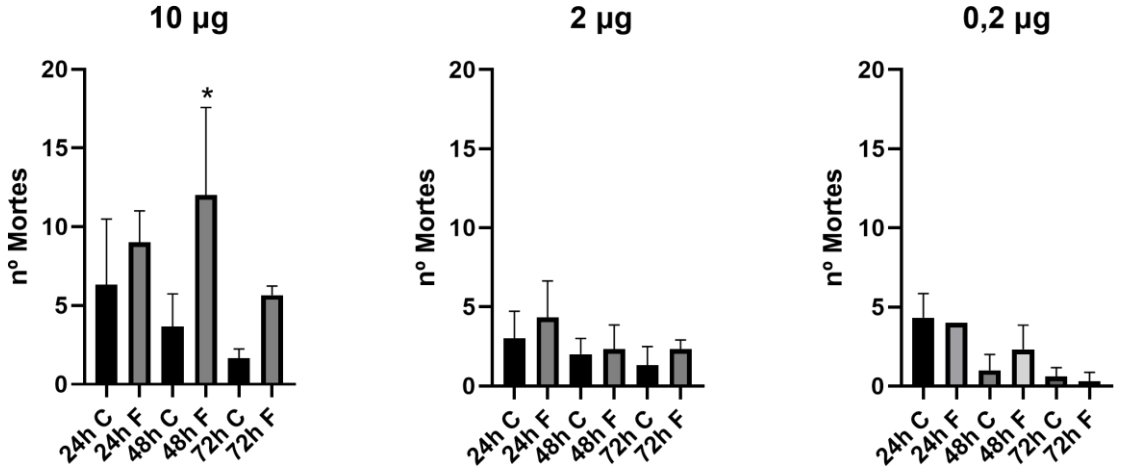
Ao testar a concentração de 2 µg de farnesol, foi observado um número menor de mortes em comparação com a concentração de 10 µg, porém, as médias do número de mortes no grupo

tratado são maiores que no grupo controle (porém, não estatisticamente significativo, Gráfico 3- B e Tabela 2, Anexo C. Às 24 horas, no grupo controle, registrou-se uma média de 3 indivíduos mortos, com DP de 1,732050808, enquanto no grupo tratou com farnesol a média foi de 4,3 mortes e DP 2,309401077. Esses valores indicam uma leve diferença na mortalidade entre os grupos, com uma tendência de aumento no grupo tratado. Após 48 horas, as médias de mortes diminuíram ainda mais. No grupo controle, a média foi de 2 abelhas mortas, DP igual a 1, enquanto no grupo tratou a média foi de 2,3 abelhas mortas, com DP 1,527525232. Esses resultados sugerem uma redução na mortalidade em comparação com as 24 horas, e as diferenças entre os grupos não são tão expressivas. Ao atingir as 72 horas, as médias de mortes continuaram a diminuir. No grupo controle, registrou-se uma média de 1,3 mortes, com DP de 1,154700538 enquanto no grupo tratado a média foi de 2,3 mortes e DP 0,577350269. Esses valores indicam uma tendência de maior mortalidade no grupo tratado em comparação com o grupo controle, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas.

Testando a menor concentração de farnesol, 0,2 µg, foram observados os menores números de mortes registradas no experimento (GRÁFICO 3C). Às 24 horas, no grupo controle, registrou-se uma média de 4,3 mortes, com DP 1,527525232, enquanto no grupo tratado com farnesol a média foi de 4 mortes de abelhas e DP igual a 0. Esses valores indicam uma quantidade semelhante de mortes nos dois grupos, sem uma diferença significativa. Após 48 horas, a média de mortes diminuiu ainda mais. No grupo controle, foi registrada uma média de 1 morte, com DP igual a 1, enquanto no grupo tratado a média foi de 2,3 mortes e DP 1,527525232. Nesse período, ainda há uma maior mortalidade no grupo tratado, mas as diferenças não são tão estatisticamente significativas. Às 72 horas, as médias de mortes continuaram a diminuir.

No grupo tratado com farnesol, registrou-se uma média de apenas 0,6 mortes e DP 0,577350269, enquanto no grupo controle a média foi de 0,3 mortes DP igual a 0,577350269. Nesse ponto, a diferença entre os grupos é menos acentuada, e o grupo tratado apresenta um valor um pouco mais elevado. Esses resultados mostram que altas concentrações de farnesol apresentam um efeito mais pronunciado na mortalidade em comparação com as concentrações mais baixas e sugerem que os ensaios dos efeitos do farnesol sobre o comportamento e a morfologia de abelhas podem ser realizados com 0,2 µg do composto.

Gráfico 3 - Média de mortes de abelhas operárias *Apis mellifera* recém-nascidas mantidas em confinamento e tratadas com dieta (açúcar+mel - 1g) a cada 24h e farnesol (10µg, 2µg e 0,2 µg), totalizando observações de 72h.



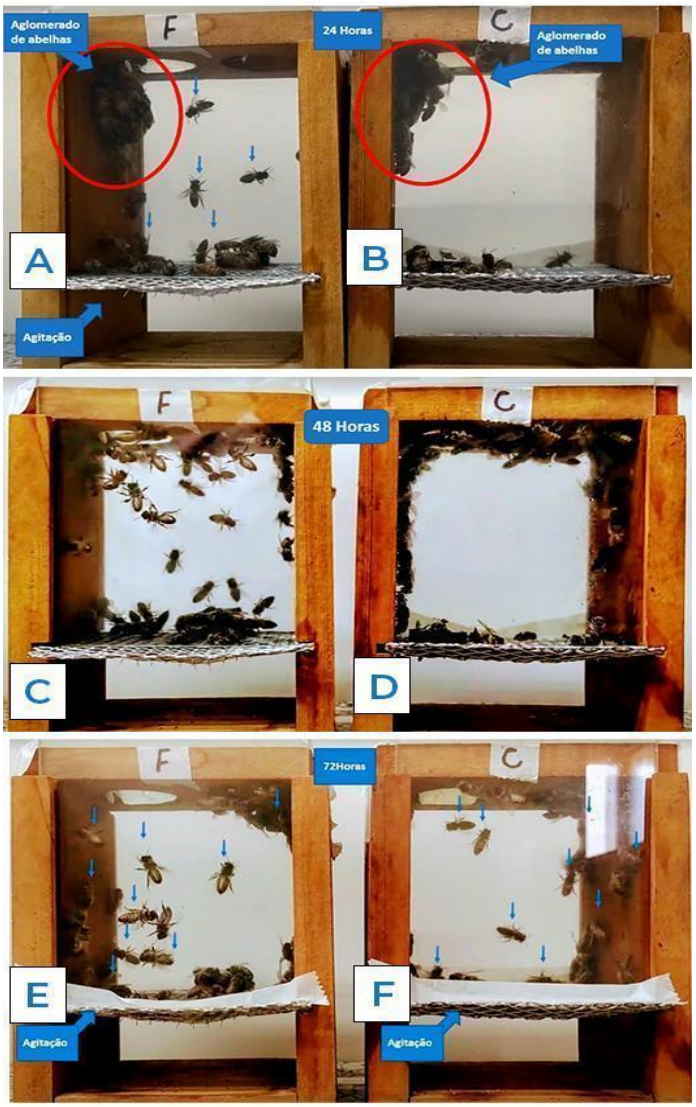
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A) Número de indivíduos mortos no grupo controle, C, e no grupo tratado com a dose de 10 µg de Farnesol, (F), por abelha. B) Número de indivíduos mortos no grupo C e no grupo tratado com 2µg de Farnesol. (F). C) Número de indivíduos mortos no grupo controle, C, e grupo tratado com 0,2 µg de Farnesol (F). São apresentadas médias e desvio padrão do número de mortes. Teste Tukey, > 0,05. Elaborado com GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022). Asterisco representa a diferença entre as médias discrepantes de cada grupo (10 µg - 48h grupo tratado com farnesol).

3.2 REGISTRO COMPORTAMENTAL

Após a definição da dose de farnesol que não aumentava a média de mortes de acordo com nossos resultados apresentados (GRÁFICO 3) realizamos ensaios comportamentais com a menor das doses de farnesol testadas anteriormente, 0,2 µg por abelha. Nossos resultados mostraram que as abelhas do grupo controle (C) apresentam diferença comportamental em relação às do grupo tratado com farnesol (F). Pode-se observar (FIGURA 13, A-B) que as abelhas de ambos grupos tiveram o comportamento de aglomeração em formato de "cacho de uva" (demarcado por círculo vermelho) no canto superior das caixas de confinamento, porém destaca-se uma pequena quantidade de abelhas dispostas separadamente no grupo tratado com farnesol, sugerindo que menos abelhas estejam aglomeradas em relação ao grupo controle. Por outro lado, as abelhas tratadas com farnesol apresentaram comportamentos mais agitados em relação às abelhas controle. Isso pode ser observado mais claramente às 48 e 72 h após início do experimento (FIGURA 13, C-F). Esta maior agitação manifestava-se pela maior frequência de voo e hiperatividade, o que nas fotos indicamos mediante setas azuis.

Figura 13 – Efeito do farnesol tópico sobre o comportamento de abelhas operárias jovens (24, 48 e 72 h) de *Apis mellifera*.



Fonte: Imagem da autora.

Legenda: Efeito do farnesol tópico sobre o comportamento de abelhas operárias jovens (24, 48 e 72 h). As abelhas receberam diariamente 1 g de alimento (açúcar + mel). As abelhas de um grupo foram tratadas com 2 µL de acetona (controle) e as do outro receberam 0,2 µg de farnesol dissolvidos em 2 µL acetona (F). A) 24 h de tratamento (F) - Abelhas aglomeradas no canto esquerdo e algumas apontadas pela seta azul, em movimento dentro do confinamento. B) 24 h de tratamento (C). Abelhas aglomeradas no canto esquerdo do confinador. C) 48 h de tratamento (F) - Várias abelhas em movimento dentro do confinador. D) 48 h de tratamento (C) Abelhas posicionadas nas extremidades do confinador. E) 72 h de tratamento (F) - Abelhas em movimento no confinador. F) 72 h de tratamento (C) - Setas azuis apontam movimentação das abelhas no confinador.

As imagens ilustram as diferenças no comportamento das abelhas tratadas com farnesol em comparação com as do grupo controle ao longo de 3 dias de tratamento. Aparentemente, no período de 72 horas, os grupos F e C exibiram uma atividade semelhante entre as 50 abelhas mantidas nos confinadores, como mostrado na Figura 13, nas posições E e F. No entanto, devido à possibilidade de algumas abelhas tentarem escapar, foi necessário colocar fita adesiva branca

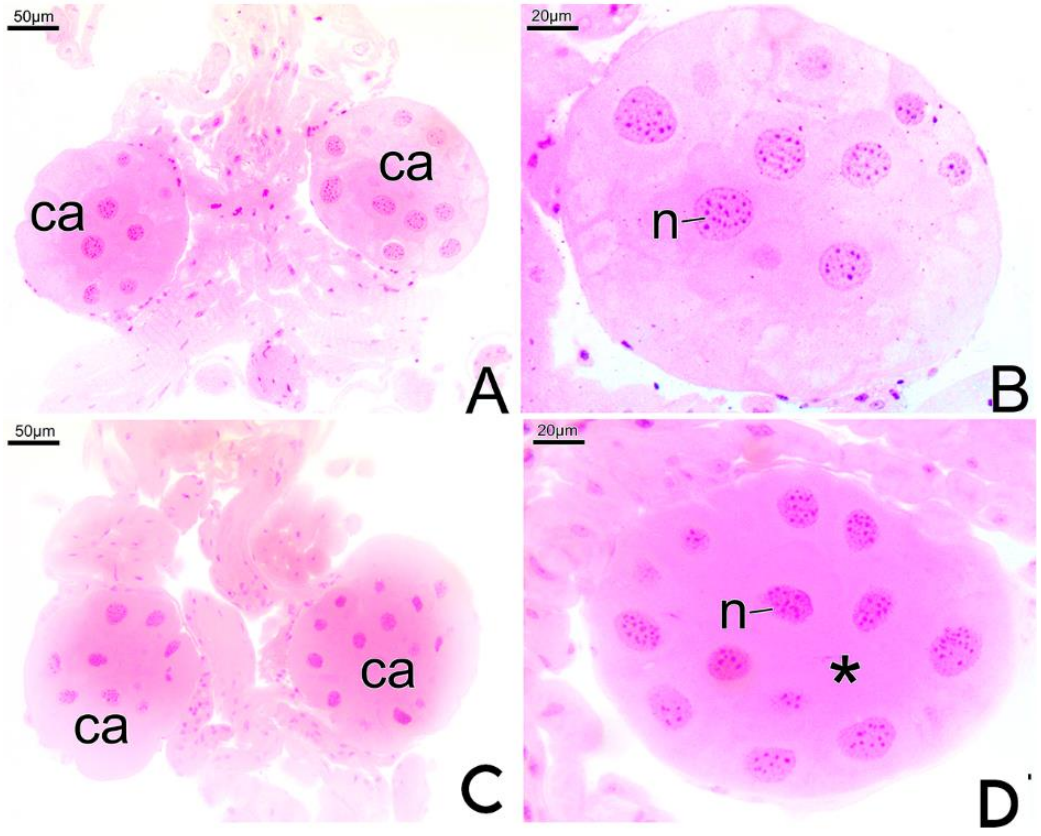
nas laterais dos observadores para evitar essa tentativa de fuga. Essa medida foi adotada para garantir que as abelhas permanecessem dentro dos confinadores durante o experimento e observação em questão.

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Com a finalidade de avaliar uma eventual influência do farnesol exógeno sobre aspectos morfológicos dos CA, foram realizados cortes histológicos dos pares de glândulas responsáveis pela síntese do HJ (hormônio juvenil). Oito pares de glândulas CA foram dissecados e incluídos em historesina, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado com farnesol. A Figura 14 mostra imagens representativas obtidas a partir do processamento dos cortes histológicos. É possível observar que tanto as glândulas quanto os núcleos das células que as compõem estão bem marcados com o corante Hematoxilina-eosina. Essa coloração permite a visualização dos detalhes morfológicos das estruturas celulares.

A análise desses cortes histológicos foi realizada para examinar diferenças na estrutura e morfologia das glândulas CA entre os grupos controle e tratado com farnesol. A presença de marcação adequada com o corante sugere que os tecidos foram preparados de maneira adequada para análise microscópica e que os detalhes morfológicos das glândulas e suas células estão visíveis para avaliação.

Figura 14 - Imagens representativas de cortes histológicos em historesina de *corpora allata* localizados no trato retrocerebral de abelhas *Apis mellifera*.



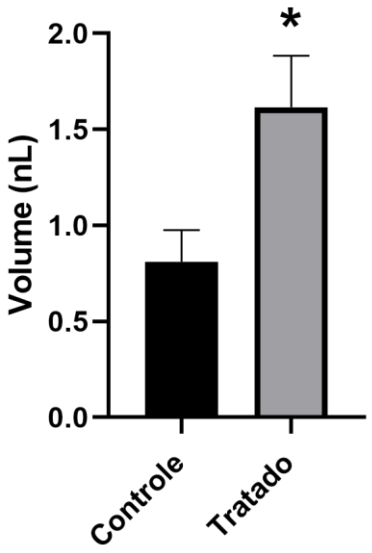
Fonte: Imagem da autora.

Legenda: As imagens A e C exibem as glândulas endócrinas - CA - com parte do esôfago entre elas, nos grupos controle e tratados, respectivamente. As imagens B e D mostram o *Corpus allatum* dos grupos controle e tratado, com evidência dos núcleos (n) e citoplasma marcado com asterisco na imagem D. Escalas de 50 µm para as imagens A e C, contínuas com objetiva de aumento de 20x, e de 20 µm para as imagens e D, usando lente de aumento de 40x. As amostras foram coradas com Hematoxilina-eosina.

Através de análise morfométrica, foi constatado que as abelhas que receberam o tratamento com farnesol apresentaram significativamente maior área e volume dos CA em comparação com o grupo controle. Esses resultados sugerem que o farnesol pode possuir propriedades promotoras do desenvolvimento dos CA nesses indivíduos. Além disso, esta análise revelou uma diferença no citoplasma entre os dois grupos de abelhas. As amostras tratadas com farnesol apresentaram um citoplasma com características mais homogêneas em comparação com o grupo controle. Essa homogeneidade pode indicar uma maior atividade celular nas amostras tratadas, possivelmente associada aos efeitos do farnesol na regulação de hormônios juvenis ou nos processos celulares. O grupo controle apresenta média de volume de

0,8 nL e um desvio padrão de 0,149228, enquanto o grupo tratado exibiu uma média de 1,62 nL com um desvio padrão de 0,264217, com P valor = 0,0004 (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 - Influência do farnesol exógeno sobre volume (nL) dos CA de operárias de abelhas *Apis mellifera* recém-nascidas mantidas em confinamento e tratadas com dieta (açúcar+mel - 1g) a cada 24 h.



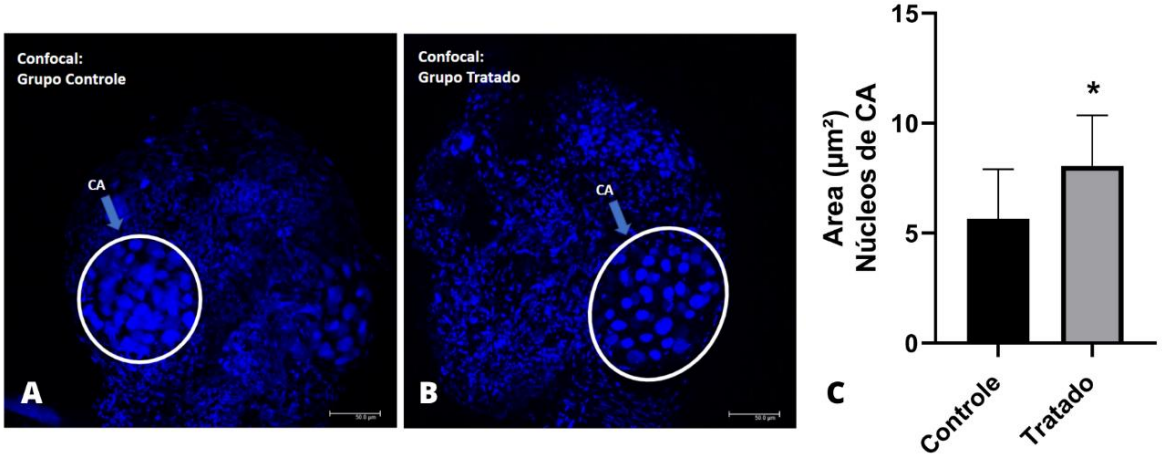
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Volume (nL) dos CA de abelhas recém-nascidas mantidas em confinamento e tratadas com dieta (açúcar+mel - 1g) a cada 24 h, comparadas ao grupo tratado com 0,2 µg de Farnesol. As observações foram realizadas ao longo de 72 horas. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student. (*) Diferença estatística, $p < 0,05$. Elaborado com GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022).

3.5 ANÁLISES CITOQUIMICAS

Utilizando microscopia confocal, realizamos análises em lâminas contendo as glândulas CA de operárias de abelhas com 72 horas de vida, com o objetivo de estudar a organização celular dessas glândulas em abelhas do grupo controle e do grupo tratado com farnesol. Foram dissecados e marcados com DAPI 8 pares de CA de abelhas de cada grupo. Medimos a área dos núcleos das células para ambos os grupos, e os resultados revelaram que as medidas morfométricas foram estatisticamente maiores nas abelhas tratadas com farnesol. Observamos que os núcleos dos CA das abelhas tratadas com farnesol apresentaram maior tamanho em relação aos núcleos do grupo controle. O grupo controle mostrou área média de 5,65 μm^2 com um desvio padrão de 225 μm^2, enquanto o grupo tratado apresentou média de 8,06 μm^2 com um desvio padrão de 2,3 μm^2. O P valor obtido foi de 0,2653, indicando a diferença estatística dessas diferenças entre os grupos (FIGURA 15).

Figura 15: Microscopia confocal das glândulas *corpora allata* de operárias de abelhas com 72 horas de vida (Gráfico 5)



Fonte: elaborada pela autora

Legenda: Análise citoquímica de *corpora allata* em abelhas recém-emergidas. A) CA dissecados e corados com DAPI, destacando a área nuclear de interesse. B) CA dissecados e corados com DAPI, também mostrando uma área nuclear de interesse, sugerindo diferença entre as médias de tamanho. C) Gráfico apresentando a diferença da área dos CA entre os grupos controle e tratado. O P valor, da análise nuclear foi de 0,265, indicado por um asterisco no gráfico. Elaborado com GraphPad Prism versão 9.4.1 (2022).

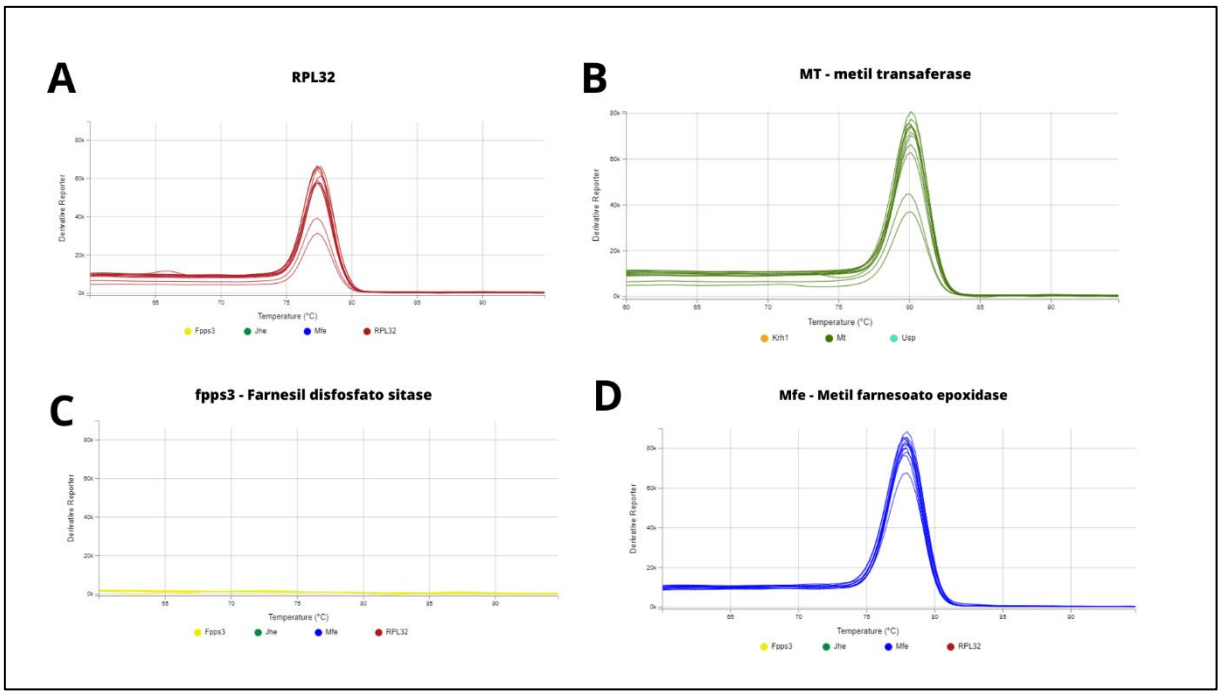
3.6 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE SÍNTESE DE HORMÔNIO JUVENIL (mt, Fpps3 e Mfe) EM *CORPORA ALLATA* DE ABELHAS JOVENS.

Em nosso experimento, foram testados genes importantes da via de síntese do hormônio juvenil (HJ), os quais desempenham um papel crucial na produção desse hormônio. A análise desses genes é de suma importância para compreender os mecanismos moleculares subjacentes à resposta da via de síntese do hormônio juvenil em abelhas. Utilizando PCR quantitativa em tempo real, conseguimos quantificar os níveis de expressão desses genes e investigar suas variações em diferentes condições experimentais. Essa análise proporciona informações valiosas sobre a regulação da síntese do hormônio juvenil e seu impacto nos processos fisiológicos e comportamentais das abelhas. Utilizando a técnica de qPCR, foram avaliados os níveis de transcrição dos genes *mfe*, *mt* e *jhe* nos CA dissecados de abelhas operárias jovens, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado. Para cada reação, a análise da curva de melting foi realizada como um controle de especificidade para o fragmento amplificado, considerando o tamanho do fragmento. Essa análise permitiu a identificação dos fragmentos amplificados dos genes alvo (TOMAZ; SANTOS; SANTOS, 2016).

A Curva de Melting do gene constitutivo *RPL32* é apresentada na Figura 16-A, com uma temperatura (Tm) de 77ºC. A Figura 16-B exibe a Curva de Melting do gene *mt*, com Tm igual a 79,5ºC, enquanto a Figura 16-C mostra o gene *Fpps3*. Nesta última curva, não foi

observado um pico de amplificação, indicando a ausência de expressão deste gene em CA de abelhas operárias adultas com 72 horas de vida. Por fim, a Figura 16-D ilustra a Curva de Melting do gene *Mfe*, com Tm igual a 77ºC.

Figura 16 - Curvas de Melting para Genes *RPL32*, *mt*, *Fpps3* e *Mfe*.

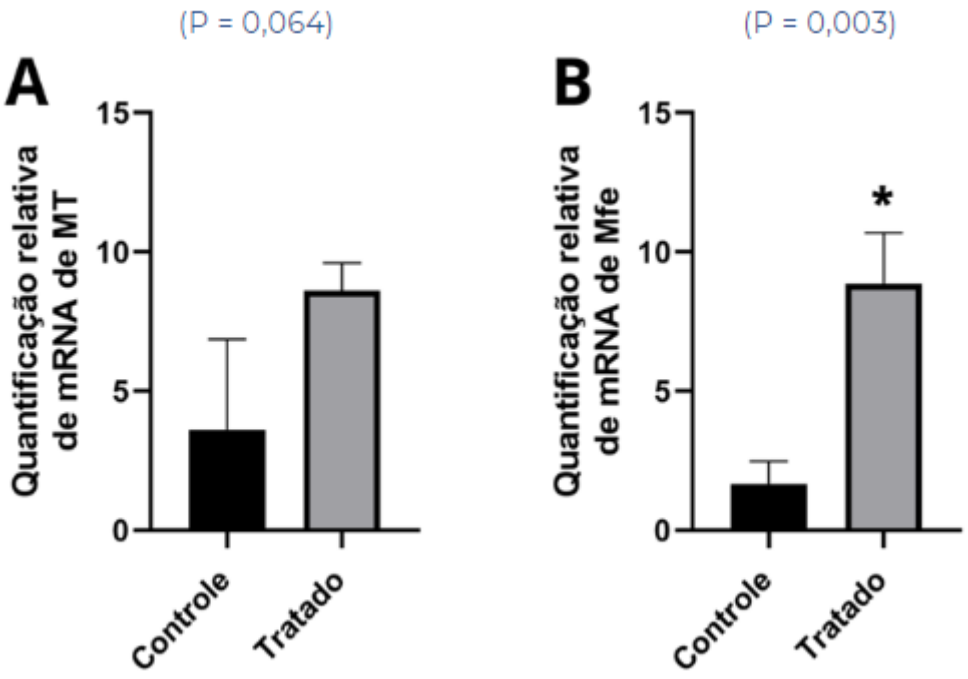


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: (A) Curva de Melting do gene RPL32 com temperatura de melting (Tm) de 77ºC. (B) Curva de Melting do gene mt com Tm igual a 79,5ºC. (C) Curva de Melting do gene Fpps3 no qual não é possível determinar a temperatura de melting. (D) Curva de Melting do gene Mfe com Tm igual a 77ºC.

Os resultados mostraram que os níveis relativos de expressão de ambos genes analisados que se mostraram expressos em CA, *mt* e *mfe*, são maiores nos CA de abelhas tratadas com farnesol tópico que nas abelhas do grupo controle (teste t, $p < 0,05$).

Gráfico 5 – Influência do farnesol tópico sobre os níveis de transcrição dos genes *mt* e *Mfe.* em *corpora allata* de operárias jovens de *Apis mellifera*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os eixos X representam os tratamentos, sendo "Controle" e "Farnesol", para cada gene específico: (A) gene *mt* (P = 0,064) DP do controle: 3,25010665 DP tratado: 1,00140859. B) gene *mfe* (P = 0,003) DP do controle: 0,81875604 DP tratado: 1,06458081. Os eixos Y representam os níveis relativos de transcrição de genes da via de síntese do hormônio juvenil (HJ), expressos como médias de 2(-ΔΔcT) mais desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, em que $p < 0,05$ é indicado no gráfico para indicar significância estatística.

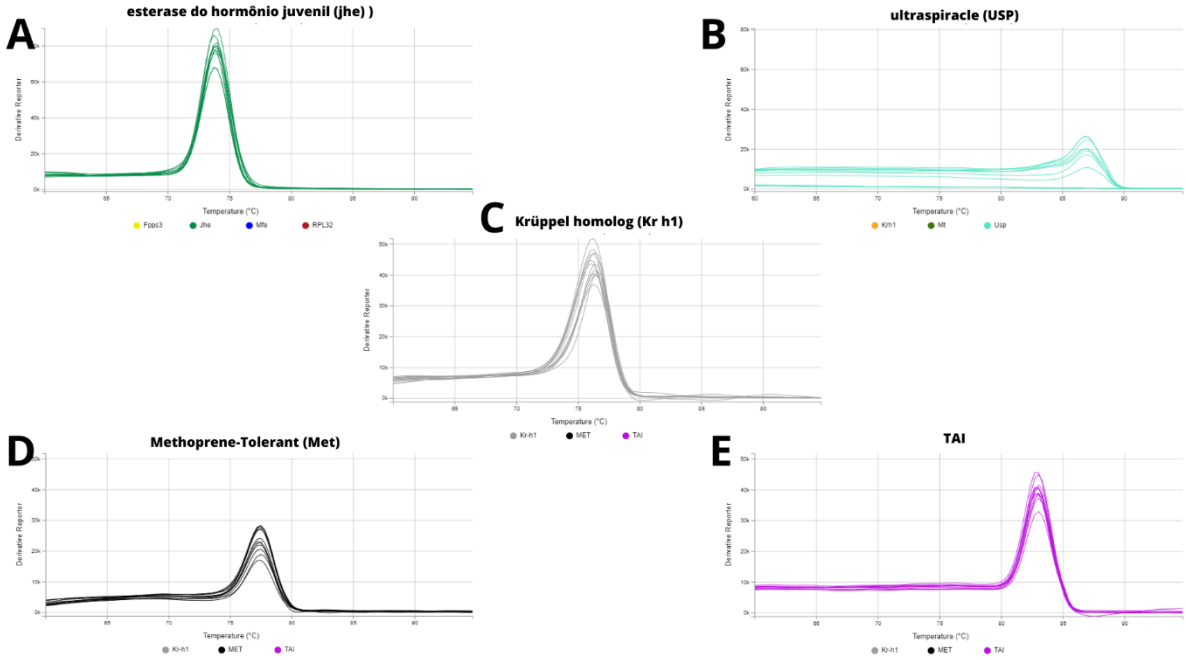
3.7 INFLUÊNCIA DO FARNESOL TÓPICO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES DE RESPOSTA AO HORMÔNIO JUVENIL EM *CORPORA ALLATA* DE ABELHAS JOVENS

Os genes investigados foram o codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*), que desempenha um papel crucial na degradação do hormônio juvenil, e os genes *Krüppel homolog (Kr h1), ultraspiracle (usp), Methoprene-Tolerant (Met)* e *TAI*. Esses genes são considerados marcadores importantes na via de sinalização dos hormônios juvenis. O nível de expressão de *jhe* pode ser utilizado como um marcador indireto da disponibilização em hemolinfa de altos títulos de HJ (para degradação) e o dos outros podem representar a resposta a eventuais aumentos nos títulos, assumindo que suas expressões sejam positivamente reguladas pela disponibilidade do hormônio.

A Curva de Melting do gene *Jhe*, apresentada na Figura 17-E, mostrou uma (Tm) de 73ºC. Na Figura 17- F, referente ao gene *usp*, não foi observado um pico de amplificação, indicando a ausência de expressão deste gene em abelhas operárias adultas com 72 horas de

vida. A Figura 17-G exibiu o gene *Krüppel homólogo (Kr h1)*, com Tm de 76ºC, enquanto a figura 17-H mostrou o gene *Metoprene-Tolerant (Met)*, com Tm de 77ºC. Na última curva, a figura 17-I, o gene *TAI* foi ilustrado, com Tm igual a 82ºC.

Figura 17 - Curvas de Melting para Genes *Jhe*, *usp*, *Krüppel* homólogo *(Kr h1)*, *Metoprene-Tolerant (Met) e TAI*

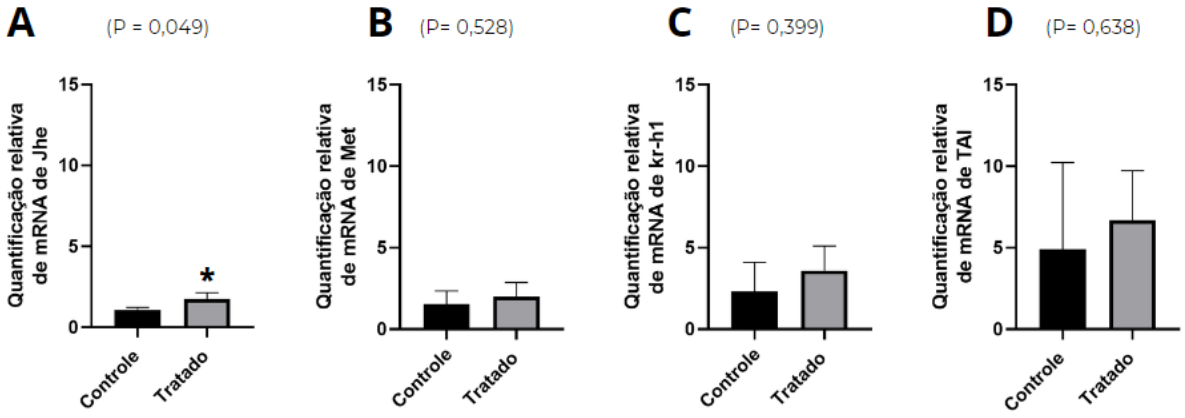


Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) Curva de Melting do gene *Jhe* com uma temperatura de Melting (Tm) de 73ºC, B: Ausência de expressão do gene usp em abelhas operárias adultas com 72 horas de vida, não sendo observado um pico de amplificação. C: Curva de Melting do gene *Krüppel homólogo (Kr h1)* com Tm de 76ºC. D: Curva de Melting do gene *Metoprene-Tolerant (Met*) com Tm de 77ºC. E: Curva de Melting do gene TAI com Tm igual a 82ºC.

A análise dos resultados obtidos revela claramente que, no grupo tratado com farnesol, houve um aumento na expressão de todos os genes em comparação ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. No entanto, dois genes em particular, *TAI* e *Krüppel homólogo (Kr h1)*, mostraram-se mais expressos (teste t, $p < 0,05$). Esses achados foram ilustrados no Gráfico 6, que representa os níveis relativos de expressão dos genes obtidos por meio de PCR quantitativa em tempo real nos CA de *A. mellifera*.

Gráfico 6 - Influência do farnesol tópico sobre os níveis de transcrição dos genes *Jhe,,* gene *Krüppel* homólogo *(Kr h1, Metoprene-Tolerant (Met)* e *TAI* em *corpora allata* de operárias jovens de *Apis mellifera*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os eixos X representam os tratamentos, sendo "Controle" e "Farnesol", para cada gene específico:(A) Gene Jhe (P = 0,049) DP controle: 0,14189303, DP tratado: 0,38680534. B) gene *Met* (P= 0,528), DP controle; 0,81673921, DP tratado: 0,86400135. C) Gene *Kr-h* (P= 0,399) DP controle: 1,81576311, DP tratado: 1,52048999. D) Gene *TAI* (P= 0,638), DP controle: 5,31128431, DP tratado: 3,01820911. Os eixos Y representam os níveis relativos de transcrição dos genes da via de síntese do hormônio juvenil (HJ) expressos como médias de 2^(-ΔΔcT). O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student, em que $p < 0,05$. Os genes que se mostraram diferencialmente expressos entre os tratamentos estão salientados com um asterisco.

4 DISCUSSÃO

4.1. O FARNESOL TÓPICO NÃO ALTERA O CONSUMO E EM DOSES ALTAS É TÓXICO EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*

Um dos objetivos iniciais de nossa pesquisa foi determinar a dose de farnesol para os ensaios de análise de influência da aplicação tópica de farnesol exógeno sobre a biologia de abelhas operárias jovens. Para definir a quantidade inicial de farnesol em cada solução, utilizamos dados fornecidos por um estudo realizado em nosso próprio grupo de pesquisa (GARCIA, 2023).

No estudo referência, foram experimentadas seis concentrações iniciais de farnesol (0,01 µg, 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 15 µg ou 20 µg) em pupas em desenvolvimento. Os resultados mostraram que as pupas expostas à menor quantidade de farnesol (0,01 µg) apresentaram uma taxa de sobrevivência mais alta em comparação com as que foram expostas a concentrações mais elevadas. Além disso, o desenvolvimento dessas pupas foi acelerado, manifestando-se por meio da pigmentação. Com base nesses resultados, sugere-se que o farnesol, como um composto encontrado naturalmente na resina de plantas, pode entrar em contato com abelhas adultas, pupas e larvas de forma natural. Portanto, o organismo dessas abelhas está adaptado para lidar com pequenas variações de farnesol sem causar grandes mudanças em seu desenvolvimento. No entanto, quando as abelhas entram em contato com concentrações mais elevadas de farnesol (15 µg ou 20 µg), o composto passa a exercer efeitos prejudiciais em seus organismos, podendo levar à morte das abelhas.

Em nossos ensaios, observamos que a aplicação tópica de 10 µg de farnesol resultou em um aumento na mortalidade das abelhas mantidas em confinamento. Com base nesse resultado, decidimos ajustar a dose utilizada nos ensaios subsequentes para minimizar o efeito adverso. Portanto, escolhemos a quantidade de 0,2 µg de farnesol por abelha, o que resultou em um menor número de mortes. Os resultados obtidos em nossa pesquisa fornecem suporte à hipótese de que o farnesol exógeno interfere na fisiologia e no comportamento das abelhas. No entanto, é importante destacar que essa interferência não resultou em um aumento no consumo das abelhas.

Juntamente a este trabalho, Matos Júnior (COELHO Jr *et al*.; IUSSI, 2021) estudou a influência do farnesol exógeno na taxa de alimentação de abelhas melíferas e encontrou diferença significativa ($p < 0,0001$) no consumo de alimentos de abelhas tratadas e não tratadas com farnesol, sendo que as abelhas tratadas consumiam maior quantidade do alimento fornecido nas primeiras 24 horas, e tal diferença persistiu até o final do experimento, às 72 horas. De Matos Júnior aponta ainda que o aumento do consumo de alimento contendo farnesol

altera o comportamento (agressividade) das abelhas. Este resultado sugere que o fator fenotípico, de maior agitação das abelhas tratadas com farnesol, aumenta o gasto de energia das abelhas, seja por maior frequência dos avanços e atividade de voo, seja por influência do HJ na lipólise, já que este hormônio estimula o metabolismo de ácidos graxos. As abelhas com este tratamento aumentaram seu consumo, seu metabolismo e possuiriam menor resistência à fome. No entanto, em nossos próprios experimentos com farnesol, observamos um consumo aproximadamente semelhante entre os grupos tratados e o grupo controle. Isso indica que o farnesol exógeno também pode alterar a concentração dos hormônios juvenis nas primeiras horas de vida de cada indivíduo, regulando o comportamento, independentemente de um aumento no consumo de alimentos. Essa hipótese foi testada por meio da análise dos níveis de transcrição de genes da via de síntese/degradação do hormônio juvenil e de genes de resposta ao hormônio. Essas análises permitiram uma compreensão mais aprofundada dos controles pelos quais o farnesol afeta o comportamento das abelhas e sua regulação hormonal. Esse conhecimento é essencial para melhorar nossa compreensão dos efeitos do farnesol nas colônias de abelhas e no funcionamento de suas sociedades.

4.2. O FARNESOL TÓPICO ALTERA O COMPORTAMENTO DE OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*

Nossos resultados mostram um aumento na movimentação das abelhas tratadas com farnesol, aumento que é mais evidente às 48 h após o tratamento. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa já mostraram que abelhas alimentadas com uma dieta suplementada com farnesol apresentam comportamento mais dinâmico em comparação com as abelhas do grupo controle COELHO Jr *et al.* (2021). Estes autores encontraram diferenças significativas entre os grupos tratados com farnesol e o grupo controle, principalmente em relação ao comportamento de avanços, agressividade, maior percepção de abelhas estranhas e início da atividade de voo quando expostos ao extrato contendo mel, açúcar e farnesol, diluído em óleo de canola. Por outro lado, estudos anteriores também indicam que os níveis de HJ são significativamente maiores em abelhas agressivas em comparação com abelhas não agressivas dentro das mesmas colônias, e, ainda, que mesmo uma pequena quantidade de HJ em contato com as abelhas durante o forrageamento pode modificar o comportamento de agressividade do indivíduo (PEARCE; HUANG; BREED, 2001).

Em conjunto, os resultados apresentados acima sugerem que as alterações comportamentais das abelhas podem estar relacionadas a uma possível maior síntese de hormônio juvenil (HJ) nas abelhas tratadas com farnesol, que é um precursor em sua via de

síntese (SULLIVAN *et al*., 2000). O farnesol incorporado pelas abelhas recém-nascidas, que normalmente possuem títulos baixos de HJ pode aumentar a disponibilidade deste precursor, que pode ser utilizado pela farnesol oxidase na produção de farnesal, assim, alimentando as enzimas das últimas etapas da via de síntese de HJ (BELLÉS; MARTÍN; PIULACHS, 2005). O aumento na produção de HJ induzido por farnesol exógeno promoveria a antecipação das alterações fisiológicas e comportamentais normalmente decorrentes do aumento normal na produção do hormônio nos primeiros dias após a emergência das abelhas adultas. Como é sabido, o HJ regula o *timing* do polietismo etário, capacitando às abelhas para o desenvolvimento de atividades que gradualmente requerem de maior esforço físico (SEELEY, 1982; JAYCOX; SKOWRONEK; GUYNN, 1974; ROBINSON; VARGO, 1997). Outra possibilidade seria que o próprio farnesol, em concentrações elevadas devido à suplementação, desempenhe funções semelhantes às do HJ (DE LOOF:SCHOOFS, 2019).

Nossos resultados, juntamente às evidências da literatura, apoiam a hipótese de que quando as abelhas entram em contato com plantas que possuem farnesol em suas resinas, podem sofrer alterações fisiológicas e comportamentais. Considerando que as resinas coletadas e transportadas à colônia são utilizadas com diversos fins, é razoável imaginar que abelhas de diversas idades de uma colônia possam entrar em contato com o farnesol e, assim, sofrer impactos semelhantes. Menos claro, porém, neste momento, é imaginar qual seria o benefício que este fenômeno acarretaria para as plantas produtoras de resina com farnesol (como *B. dracunculifolia*). Isto porque as abelhas forrageiras normalmente parecem especializar-se na coleta de um tipo de "produto", néctar, pólen ou resina (RIBBANDS, 1952; SEELEY, 1995). Um eventual benefício poderia surgir se uma mesma abelha pudesse coletar em um momento particular resina e, simultaneamente ou ainda durante sua vida, já conhecendo a planta produtora de resina, coletasse também algum outro produto que permitisse eventos de polinização, o que parece ser possível (SEELEY, 1995).

4.3. O FARNESOL TÓPICO ALTERA OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS MORFOLOGIA DOS CORPORA ALLATA DE OPERÁRIAS JOVENS DE APIS MELLIFERA

Nossos resultados apontam que o volume dos CA no grupo tratado com farnesol foi significativamente diferente em comparação com o grupo controle. O volume dos núcleos das células também foi medido por meio de análise de imagem de microscopia confocal no software ImageJ, e a diferença de tamanho entre os grupos também foi estatisticamente significativa.

Estes resultados sugerem que o farnesol exógeno altera a morfologia das glândulas CA em abelhas *Apis mellifera*,

Os resultados obtidos no trabalho desenvolvido por Coelho Jr *et al*. (2021) forneceram dados importantes sobre os efeitos do farnesol na morfologia dos CA das abelhas. Foi observado um aumento significativo na área e no volume das CA das abelhas que receberam dieta suplementada com farnesol em comparação com as abelhas controle. Além disso, a marcação dos núcleos dos CA com DAPI revelou que os núcleos das abelhas suplementadas com farnesol são maiores em comparação com os núcleos das abelhas controle. Esses resultados, em concordância com nossos achados, sugerem que tanto a presença do farnesol na dieta quanto a aplicação tópica podem estar promovendo um aumento na transcrição de genes envolvidos na síntese e na degradação do hormônio juvenil (HJ) nas glândulas CA das abelhas. O aumento da área e volume dos núcleos celulares pode indicar uma maior atividade metabólica e de transcrição gênica nesta região. Ao correlacionar nossos resultados com os apresentados por Coelho *et al.* (2021), é possível afirmar que o farnesol exógeno afeta a morfologia dos CA, possivelmente por meio da modulação da transcrição de genes relacionados à síntese, degradação e resposta ao HJ.

4.4. O FARNESOL TÓPICO ALTERA O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DA VIA DE SÍNTESE DE HORMÔNIO JUVENIL (mt e Mfe) EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*

Na via de síntese do hormônio juvenil, um dos intermediários é o metil farnesoato (MF), que desempenha uma função semelhante ao HJ-III em insetos. A enzima O-metiltransferase do ácido farnesóico (MT) é responsável pela conversão do ácido farnesóico (FA) em MF, usando a molécula S-adenosil-L-metionina (SAM) como co-fator. Os passos finais da síntese do HJ incluem também epoxidação de precursores, mediante a ação de uma *MFE* (SANTOS, 2008). Nossos ensaios revelaram uma maior expressão dos genes *mfe* e *mt* nos grupos tratados com farnesol em comparação com os grupos controle. Isso sugere que estes genes possam estar sendo induzidos a aumentar sua expressão em presença de um precursor, o farnesol, permitindo, assim, aumentar a produção de HJ. Esses resultados apontam para uma possível relação entre o farnesol e a regulação do HJ, já que os genes em questão fazem parte da etapa final da via de síntese do hormônio. Em suma, nossos dados indicam que os genes *mfe* e *mt* estão envolvidos na regulação dos níveis de HJ em abelhas jovens recém emergidas.

Por outro lado, no estudo de Jarau *et al.* (2010) foi identificado o geraniol nas secreções das glândulas labiais das abelhas nutrizes como o fator determinante da casta em abelhas *Melipona beecheii*. Esse composto exerce controle sobre o destino da casta. Larvas fêmeas se desenvolvem como rainhas apenas quando recebem quantidades suficientes de geraniol. Além disso, o geraniol pode estar relacionado à regulação gênica e atuar como precursor do hormônio juvenil em abelhas eussociais. A correlação entre nossos resultados e o estudo de Jarau sugere que o farnesol e o geraniol estão envolvidos na regulação da produção do hormônio juvenil em abelhas, desempenhando um papel importante no desenvolvimento das castas e na regulação dos níveis hormonais em abelhas jovens.

4.5. O FARNESOL TÓPICO ALTERA O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE RESPOSTA AO HORMÔNIO JUVENIL EM OPERÁRIAS JOVENS DE *APIS MELLIFERA*

Nossos resultados demonstram que as operárias tratadas com farnesol exibiram uma expressão maior de *JHE* em comparação com as abelhas do grupo controle. A *JHE* é responsável pela remoção do hormônio juvenil (HJ) de circulação na hemolinfa das abelhas (HINTON e HAMMOCK, 2001). Essas descobertas sugerem que o farnesol pode estar desempenhando um papel na regulação dos hormônios juvenis nas abelhas, influenciando o aumento na expressão de *JHE*. Essa elevação na atividade pode resultar em uma rápida degradação do HJ, levando a níveis mais baixos do hormônio circulante. Nossa pesquisa apresenta também resultados consistentes com estudos que mostram outros genes de resposta ao hormônio juvenil. *In vitro*, estudos de Lozano *et al*., 2014 identificaram o complexo contendo Metopreno (*Met*) e Taiman (*Tai*) como o receptor dos hormônios juvenis (JINDRA *et al*., 2015). Além disso, experimentos dos mesmos autores, em *Blattella germanica*, revelaram que as isoformas Tai contendo IN-1 estão envolvidas na transdução do sinal JH, reprimindo a metamorfose. Essa descoberta sugere um aumento nos níveis de hormônios juvenis circulantes, o que pode ter um impacto significativo no comportamento, fisiologia e morfologia das abelhas recém-emergidas. Esses achados reforçam a importância dos hormônios juvenis na regulação desses processos biológicos. Em outro estudo realizado com *Drosophila melanogaster*, foi observado que os hormônios juvenis (JH) são importantes na regulação da formação de cerdas e cutícula pupal no abdômen. Especificamente, o fator de transcrição Krüppel homólogo 1 (Kr-h1) foi identificado como sendo regulado positivamente por JH durante o desenvolvimento adulto (MINAKUCHI *et al*., 2008). Consequentemente, o farnesol pode estar modulando a disponibilidade e a atividade do hormônio juvenil nas abelhas, o que pode impactar significativamente seu desenvolvimento e comportamento.

5 CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos resultados e os de Coelho *et al*. (2021) indicam que:

A aplicação tópica de 10 µg de farnesol resulta tóxico para as abelhas jovens.

As abelhas tratadas com 0,2 µg de farnesol apresentaram aumento na movimentação, especialmente às 48 horas após o tratamento.

O volume dos CA no grupo tratado com farnesol foi significativamente diferente do grupo controle, sugerindo que o farnesol pode influenciar a morfologia das glândulas CA em abelhas.

A expressão dos genes *mfe* e *mt*, representantes da via de síntese de HJ, o os genes de resposta ao HJ *Jhe, usp, Krüppel homólogo (Kr h1), Metoprene-Tolerant (Met)* e *TAI,* foi maior nos grupos tratados com farnesol em relação aos grupos controles, indicando uma possível relação entre o farnesol e a regulação do hormônio juvenil (HJ) nas abelhas recém-emergidas.

O farnesol exógeno promove alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas em abelhas jovens de *Apis mellifera,* possivelmente, ao ser utilizado como precursor para a síntese de HJ ou mediante ação semelhante ao próprio HJ. As alterações morfológicas dos CA e as alterações nos níveis de expressão de genes da via de síntese de HJ em abelhas tratadas com farnesol apoiam a primeira explicação.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, Severino M. *et al*. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural,** São Paulo, v. 35, n. 4, p. 09-915, 2005.

ANTONIALLI-JÚNIOR, William Fernando; CRUZ-LANDIM, Carminda da. Efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil sobre o desenvolvimento dos ovários de larvas de operárias de *Apis mellifera Linnaeus (Hymenoptera, Apidae).* **Revista Brasileira de Entomologia,** São Paulo, v. 53, n. 1, p. 115-120, 2009.

ASHBURNER, M.; Sullivan, W.; Hawley, R. **Drosophila protocols**. Ed. NewYork. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. 2000.

BARCHUK, Angel R. *et al.* Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology,** São Paulo, v. 70, n. 7, 2007.

BASTOS *et al*. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Braz J Biol.,** São Carlos – SP, v. 71, n. 3, p. 727-34, 2011.

BEETSMA, Jochum. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World,** EUA, v. 60, p. 24-39, 1979.

BELLÉS, Xavier; MARTÍN, David.; PIULACHS, Maria Dolors. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. **Annu Rev Entomol.,** EUA, v. 50, p. 181-199, 2005.

BOMTORIN, Mackert A. *et al.* Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the *corpora allata* of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. **PLoS One,** Ribeirão Preto – SP, v. 9, n. 1, e86923, 2014.

CARDOSO-JUNIOR *et al.* Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. **J Insect Physiol,**, v. 101, p. 185-194, 2017.

COELHO-JÚNIOR, Valdeci Geraldo. **Influência do farnesol exógeno sobre aspectos fisiológicos de abelhas *Apis mellifera***. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2019.

DE LOOF A *et al.* Farnesol-like endogenous sesquiterpenoids in vertebrates: the probable but overlooked functional "inbrome" anti-aging counterpart of juvenile hormone of insects? **Front Endocrinol**, Leuven, Belgium, v. 6, n. 5, p. 222, 2015.

DE LOOF, A, Schoofs L. Mode of action of farnesol, the "noble unknown" in particular in ca^{2+} homeostasis, and its juvenile hormone-esters in evolutionary retrospect. **Front Neurosci.,** v, 25, n. 13, p. 141, 2019.

EL-SAYED, Ashraf M. **The Pherobase:** Database of pheromones and semiochemicals. 2023 Disponível em: http://www.pherobase.com. Acesso em: 24 jul. 2023.

GALEANO, Zioneth Judith G. **Mudanças morfológicas e glandulares associadas ao polietismo etário em *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae).** 2010. 44 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GARCIA, H. J. **Influência do farnesol exógeno sobre a dinâmica do desenvolvimento pupal de operárias *Apis mellifera***. 2023. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais.

GONÇALVES, Lionel; STORT, A. Honey Bee Improvement Through Behavioral Genetics. **Annual Review of Entomology,** Universidade Estadual Paulista (UNESP) – SP, v. 23, p. 197-213, 2003.

GIANNONI - Guzmán, M. A.; GIRAY, T.; AGOSTO-RIVERA, J. L. Shift work dynamics and division of labor: honeybee foraging and fanning tasks. **BioRxiv,** University of Puerto Rico - Mayaguez 2020

GRIMALDI, David.; ENGEL, Michael S. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, New York, NY, USA, 2005.

HARTFELDER, Klaus. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. **Braz J Med Biol Res.** Ribeirão Preto – SP, v. 33, n. 2, p. 157-77, 2000.

HARTFELDER, Klaus *et al.* Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie,** Ribeirão Preto – SP, v. 37, n. 2, 2006.

HINTON, A. C; Hammock, B. D. Purification of juvenile hormone esterase and molecular cloning of the cDNA from *Manduca sexta*. **Insect Biochem Mol Biol.,** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- SP, v. 32, n. 1, p, 57-66, 2001.

HUANG, Zhi-Yong *et al*. Hormonal regulation of behavioural development in the honeybee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. **Journal of Insect Physiology,** Carl R. Woese Institute for Genomic Biology- United States, v. 37, n. 10, p. 733-741, 1991.

JARAU, S. *et al.* Workers make the queens in melipona bees: identification of geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. **Journal of Chemical Ecology,** Universität Ulm, Germany, v. 36, p. 565–569, 2010.

JAYCOX, Elbert R.; SKOWRONEK, W., GUYNN, Godfray. Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. **Annals of The Entomological Society of America,** United States, v, 67, p. 529-534, 1974.

JINDRA, M. *et al.* Genetic evidence for function of the bhlh-pas protein gce/met as a juvenile hormone receptor. **PLoS Genet.,** San Francisco, California, US, v. 10, n. 11, e1005394, 2015.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behav Ecol Sociobiol,** EUA, v. 64, n. 3, p. 305-316, 2010.

KUROPATNICKI, Andrzej. K.; SZLISZKA, Ewelina; KROL, Wojciech. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-based complementary and alternative medicine,** EUA, s.v., p. 1-11, 2013.

LAGO, Romoff P. *et al.* Composition of essential oils from the leaves of six species of the Baccharis genus from "Campos de Altitude" of the atlantic forest of São Paulo. **Química Nova,** São Paulo, v. 31, p. 727-730, 2007.

LIU P, Peng H. J, ZHU J. Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein. **Proc Natl Acad Sci.,** EUA, v. 14, n. 112, E1871-9, 2015.

LIVAK, Kenneth J., SCHMITTGEN Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods.** Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Washington State University, Pullman, Washington, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

Lozano, J. *et al.* A role for Taiman in insect metamorphosis. **PLoS Genetics,** São Francisco, Califórnia, v. 10, n. 10, e1004769, 2014.

MICHENER, Charles D. Comparative social behavior of bees. **Annual Review of Entomology,** EUA, v. 14, p. 299-342, 1969.

MINAKUCHI, C.; ZHOU, X.; RIDDIFORD, L. M. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. **Mechanisms of Development**, v. 125, n. 1-2, p. 91-105, 2008.

MORGANTE, Carolina V.; BLAWID, Rosana. **Análise da expressão gênica pela técnica de pcr quantitativa em tempo real**: princípios e fundamentos. Petrolina/PE: Embrapa semiarido, 2016. 63p.

NAOKI, Mori; KOJI, Noge. Recent advances in chemical ecology: complex interactions mediated by molecules. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** EUA, v. 85, n. 1, p. 33-41, 2021.

NEWMAN, John W.; MORISSEAU, Christophe; HAMMOCK, Bruce. D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. **Prog Lipid Res.,** EUA, v. 44, n. 1, p. 1-51, 2005.

NORIEGA, Fernando G. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? **Insect Biochem Mol Biol.,** n. 34, v. 7, p. 687-693, 2004.

PEARCE, A. N.; HUANG, Z. Y.; BREED, M. D. Juvenile hormone and aggression in honey bees. **J Insect Physiol.**, v. 47, n. 11, p. 1243-1247, 2001.

PUBCHEM. **National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information:** resumo do composto PubChem para-CID 445070, Farnesol, 2021. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Farnesol. Acesso em: 10 out. 2021.

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA MET, 2020. UNESP. Disponível em: https://www.ibb.unesp.br/Home/sobreocampus/administracao/unidadesauxiliares/centrodemicroscopiaeletronica-cme/protocolo-de-processamento-de-amostras-para-met.pdf. Acesso em 31 jan. de 2023.

RIBBANDS C. R. Division of labour in the honeybee communityProc. **R. Soc. Lond.,** v. 140, n. 898, p. 32-42, 1952.

RIDDIFORD, Lynn. M.; HEWES, Randall S.; TRUMAN, James W. Dynamics and metamorphosis of an identifiable peptidergic neuron in an insect. **J. Neurobiol.,** EUA, n. 25, p. 819-830, 1994.

ROBINSON Gene E.; VARGO Edward L. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. **Arch Insect Biochem Physiol.,** v. 35, n. 4, p. 559-83, 1997.

ROSKOV, Y. *et al.* **Catálogo Species 2000 & ITIS da Life Naturalis, Leiden, Holanda**. 2018. Disponível em: https://powo.science.kew.org/. Acesso em: 20 jul. 2023.

SANTOS, Aline Mackert dos. **Biologia molecular de genes envolvidos no metabolismo do hormônio juvenil em *Apis mellifera*.** 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

STAROSTA, Paul, **Photograph naturalist**. Disponível em: http://www.paulstarosta.com/abeille. Acesso em 29 out. 2022.

SCHUMANN, N. A. B. *et al.* Three-dimensional reconstruction of *Corpora allata* nucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. **Apidologie,** França, v. 50, p. 330-339, 2019.

SEELEY T. D. **The wisdom of the hive. Harvard Univ**. Press, Cambridge, MA, 1995.

SEELEY, T.D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behav Ecol Sociobiol,** v. 11, p. 287–293, 1982.

SCHOOLEY DA, Judy K. J. *et al.* Biosynthesis of the Juvenile Hormones of *Manduca sexta*: labeling pattern from mevalonate, propionate, and acetate. proc **Natl Acad Sci.,** v. 70, n. 10, p. 2921-5, 1973.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology.united states department of agriculture, bureau of entomology**. 1ª ed., 2ª impressão. McGraw-Hill Book Company, Inc., Nova York e Londres, 1935.

TEIXEIRA, E. W. *et al.* Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. Evid Based **Complement Alternat Med.,** v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TOMAZ, Paulo Roberto Xavier; SANTOS, Juliana da Rocha dos; SANTOS, Paulo Caleb Júnior de Lima. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de melting. **RBAC,** v. 48, n. 1, p. 19-23, 2016.

VIEIRA, Carlos U. **Expressão de genes das vias de biossíntese e degradação do hormônio juvenil e caracterização de peptídeos ligantes ao cérebro de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

VIEIRA, N. K *Baccharis dracunculifolia*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Orgs**.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. Capítulo 5, pp. 556-560.

KARNOVSKY. **Protocolo de processamento de amostras para MET**: preparo da solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) (volume final de 100ml). Disponível em: Acesso em: 02 nov. 2022.

WANG Y, Baker N, AMDAM G. V. RNAi-mediated double gene knockdown and gustatory perception measurement in honey bees (*Apis mellifera*). **J Vis Exp.,** v. 25, n. 77, 50446, 2013.

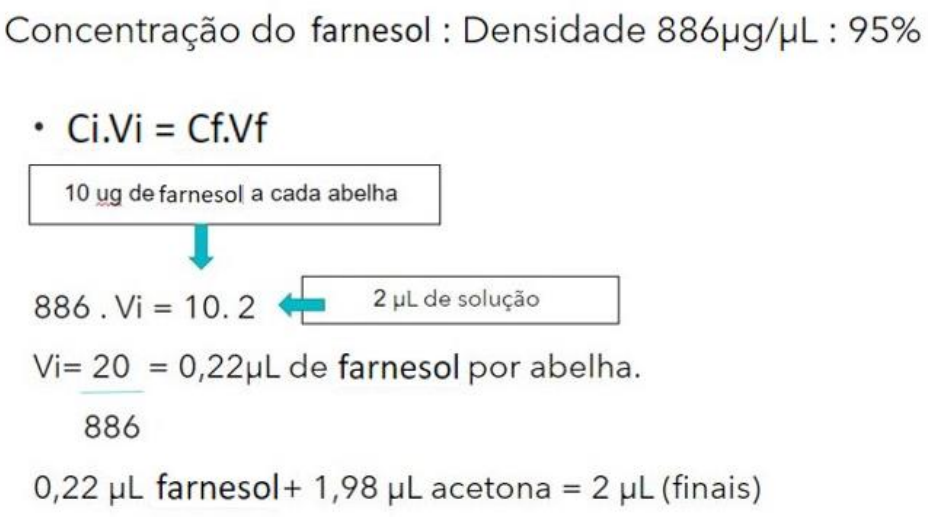
WILSON, Edward O. **The insects societies**. Cambridge: Harvard University, 1971.

WILSON, M. B *et al*. Metabolomics reveals the origins of antimicrobial plant resins collected by honey bees. **PLoS One,** São Francisco, Califórnia, v. 18, n. 8, e77512, 2013.

ANEXO A - MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA APLICAÇÃO DE FARNESOL TÓPICO NAS ABELHAS RECÉM EMERGIDAS

- 200 µL de acetona (Proquimios, Lote: 06/0150);
- 2,2 µL de farnesol - (Sigma Aldrich; catálogo: F203-5g; lote: MKBG0101V);
- 3 Micropipetas graduadas (2, 20 e 200 µL);
- Caixas de Ponteiras de 10 e 200 uL;
- 3 Tubos Eppendorf - 1,5ml graduado transparente;
- 1 Caixa de isopor térmica com Capacidade de 13 Litros (Medidas: externas - 34,5 cm de comprimento x 23,5 cm de largura x 29,3 cm de altura Internas: 30 cm de comprimento x 19,0 cm de largura x 24,5 cm de altura);
- Gelo em escamas/gelox.

Figura 18 – Descritivo do cálculo final da quantidade necessária (não letal) de farnesol utilizado para aplicação em cada abelha**.**



Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO B – CAIXAS DE OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS DAS ABELHAS DO GRUPO CONTROLE(C) E GRUPO TRATADO COM FARNESOL (F)

Para a separação dos materiais necessários para aplicação e observação desta etapa, verificamos a quantidade e a devida higienização:

- 2 Caixas de confinamento limpas;
- 2 Recipientes para alimentação;
- 2 Recipientes para água.

Preparo da solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) (volume final de 100ml)

- 50 ml de paraformaldeído a 8%
- 10 ml de glutaraldeído 25%
- Completar com tampão fosfato 0,2M, pH 7,3

ANEXO C

Tabela 2 - Resultados da análise do consumo diário dos grupos de controle e tratados, coletados em diferentes períodos de observação (24, 48 e 72 horas). TABELA A: exibe as médias externas de consumo para cada grupo, destacando as medições realizadas em cada uma das horas (24, 48 e 72 horas). TABELA B: mostra os desvios padrão dos grupos controle e tratado, separados para cada hora de observação (24, 48 e 72 horas).

A

Media de consumo							
	Aplicação	24horas C	24horas F	48horas C	48 horas F	72horas C	72 horas F
10ug	1º	1	0,9	1	0,7	0,8	0,5
	2º	1	0,9	0,7	0,9	0,4	0,2
	3º	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4
	MÉDIA	0,8333333333	0,8	0,7333333333	0,7333333333	0,6	0,3666666667
2ug	4º	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,5
	5º	0,8	0,4	0,7	0,4	0,6	0,3
	6º	0,4	0,8	0,3	0,3	0,3	0,3
	MÉDIA	0,7	0,6666666667	0,5666666667	0,4666666667	0,5333333333	0,3666666667
0,2ug	7º	0,6	0,4	0,4	0,3	0,6	0,3
	8º	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3
	9º	0,6	0,5	0,6	0,5	0,4	0,3
	MÉDIA	0,6	0,4666666667	0,5	0,3666666667	0,5	0,3

B

Desvio Padrão: Consumo							
	Aplicação	24horas C	24horas F	48horas C	48 horas F	72horas C	72 horas F
10ug	1º	1	0,9	1	0,7	0,8	0,5
	2º	1	0,9	0,7	0,9	0,4	0,2
	3º	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4
	DEVPAD	0,2886751346	0,1732050808	0,2516611478	0,1527525232	0,2	0,1527525232
2ug	4º	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,5
	5º	0,8	0,4	0,7	0,4	0,6	0,3
	6º	0,4	0,8	0,3	0,3	0,3	0,3
	DEVPAD	0,2645751311	0,2309401077	0,2309401077	0,2081665999	0,2081665999	0,1154700538
0,2ug	7º	0,6	0,4	0,4	0,3	0,6	0,3
	8º	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3
	9º	0,6	0,5	0,6	0,5	0,4	0,3
	DEVPAD	0	0,05773502692	0,1	0,1154700538	0,1	0

ANEXO D

Tabela 3 - Resultados da análise do MORTE diário dos grupos de controle e tratados, coletados em diferentes períodos de observação (24, 48 e 72 horas). TABELA A: Apresenta as médias de MORTE para cada grupo, destacando as medições realizadas em cada uma das horas (24, 48 e 72 horas). TABELA B: Mostra os desvios padrão dos grupos controle e tratado, separados para cada hora de observação (24, 48 e 72 horas).

A

Media de Mortes							
	Aplicação	24horas C	24horas F	48horas C	48 horas F	72horas C	72 horas F
10ug	1º	3	11	3	6	2	5
	2º	5	7	2	13	1	6
	3º	11	9	6	17	2	6
	média	6,333333333	9	3,666666667	12	1,666666667	5,666666667
2ug	4º	5	7	1	2	2	2
	5º	2	3	3	4	2	3
	6º	2	3	2	1	0	2
	média	3	4,333333333	2	2,333333333	1,333333333	2,333333333
0,2ug	7º	4	4	2	4	0	1
	8º	6	4	0	2	0	0
	9º	3	4	1	1	1	1
	média	4,333333333	4	1	2,333333333	0,333333333	0,666666667

B

Desvio Padrão: Morte							
	Aplicação	24horas C	24horas F	48horas C	48 horas F	72horas C	72 horas F
10ug	1º	3	11	3	6	2	5
	2º	5	7	2	13	1	6
	3º	11	9	6	17	2	6
	DEVPAD	4,163331999	2	2,081665999	5,567764363	0,5773502692	0,5773502692
2ug	4º	5	7	1	2	2	2
	5º	2	3	3	4	2	3
	6º	2	3	2	1	0	2
	DEVPAD	1,732050808	2,309401077	1	1,527525232	1,154700538	0,5773502692
0,2ug	7º	4	4	2	4	0	1
	8º	6	4	0	2	0	0
	9º	3	4	1	1	1	1
	DEVPAD	1,527525232	0	1	1,527525232	0,5773502692	0,5773502692