



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

**Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a
mortalidade e alterações comportamentais de *Apis
mellifera* L.**

Juliana Sartori Lunardi

BOTUCATU – SP
2018

Juliana Sartori Lunardi

Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de *Apis mellifera* L.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de concentração: Zoologia.

Orientadora: Profa. Adj. Percilia Cardoso Giaquinto
Coorientador: Prof. Ass. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

BOTUCATU – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lunardi, Juliana Sartori.

Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de *Apis mellifera* L. / Juliana Sartori Lunardi. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Capes: 20400004

1. Abelhas. 2. Herbicidas. 3. Glifosato. 4. Produtos químicos agrícolas.

Palavras-chave: 2,4-D; abelhas; agrotóxico; glifosato; herbicida.

DEDICO

À minha família: minha mãe Paula; avós Virna, Virgínio, Roberto e Rosely; tias Luciana Sartori, Luciana Lunardi, Aurea; tios Robertinho e Marcelo e primos, por todo o amor e carinho, pelos ensinamentos, pelo incentivo e por me proporcionarem tantas oportunidades que me permitiram e permitem estudar, conhecer culturas, línguas, pessoas e a natureza, e ainda amadurecer e ser uma melhor pessoa e bióloga.

AGRADECIMENTOS

À professora Percília Cardoso Giaquinto e ao professor Ricardo de Oliveira Orsi, pela orientação, confiança, por contribuírem com o meu desenvolvimento profissional e deste trabalho e por me permitirem unir dois mundos que eu amo.

Aos amigos do Laboratório de Comportamento e Fisiologia de Animais Aquáticos, Adriana, Vanessa, Nina, Isabela Mello, Isabela Guermandi, Marina, Bruno, João, Rafaela, Renata, por me receberem tão carinhosamente no grupo e ainda me ouvirem falar de abelha. Aos amigos do NECTAR, Rodrigo, Thaís, Samir, Adriana, Cinthia, Alex, Daniel, Marcelo, Maurice, Wellington, Roney e Maurício por serem sempre tão atenciosos e disponíveis, desde o estágio na graduação, o TCC e durante os experimentos do mestrado. Aos dois grupos agradeço por aceitarem minhas idas e vindas entre IB e Lageado e, principalmente, pela amizade e ajuda ao longo do mestrado, seja através do café e conversa até os congressos e ajudas com burocracias.

Ao Matheus pelo companheirismo e paciência ao longo desses dois anos e aos amigos de escola e graduação, Marina, Ana Liz, Nina, Eliza, Andrei, por estarem sempre presentes, mesmo quando a vida dificulta nossos encontros.

Ao Instituto de Biociências e ao departamento de Zoologia, pela oportunidade de fazer parte do programa de Pós-Graduação, assim como aos professores pelas disciplinas oferecidas e colegas pelo companheirismo.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, à Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação do Câmpus de Botucatu, aos secretários do Departamento de Produção Animal (FMVZ) e de Fisiologia (IB) pelo auxílio prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com esta pesquisa e a conclusão do mestrado.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	1
CAPÍTULO I	2
Considerações Iniciais	3
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i>	3
2. Estrutura social das abelhas: a divisão de trabalho.....	4
3. O papel dos polinizadores.....	5
4. Declínio das abelhas.....	6
5. Agrotóxicos.....	9
6. Herbicidas.....	10
6.1. Glifosato.....	10
6.2. 2,4-D.....	12
6.3. Associação entre herbicidas.....	13
Objetivo	14
Referências	15
CAPÍTULO II	22
Resumo.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	32
Discussão.....	33
Conclusão.....	37
Referências.....	38
ANEXO A - Protocolo CEUA	44
ANEXO B - Manuscrito	45

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação será apresentada em capítulos, sendo o primeiro, intitulado considerações iniciais, uma introdução geral sobre a espécie a ser estudada, a problemática ambiental em questão e os herbicidas escolhidos devido ao seu intenso uso no Brasil e no mundo. O segundo capítulo será apresentado nos moldes de manuscrito e ao final do trabalho está a versão que vem sendo elaborada para submissão conforme os moldes da revista *Apidologie*.

Capítulo I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera*

As abelhas melíferas são insetos comuns e bastante conhecidos, isso, devido ao seu distinto formato de corpo e asas, além da sua coloração. As abelhas melíferas são as mais importantes quando se trata da polinização das plantas sendo, inclusive, economicamente valiosa dada a produção anual em torno de 300 milhões de dólares em produtos apícolas (TRIPLEHORN; JONNISON, 2011).

Originária da África, a *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) espalhou-se pela Ásia e Europa. Através da migração a espécie diferenciou-se em inúmeras subespécies cuja morfologia, comportamento e fisiologia são diferentes. A introdução das abelhas europeias no Brasil aconteceu no século XIX por meio da imigração, quando em 1839, o Padre Antônio Carneiro trouxe para o país, no Rio de Janeiro, as primeiras colônias de *Apis mellifera mellifera*, as abelhas pretas (WIESE, 2005; PARKER et al., 2010).

Quarenta anos mais tarde, em 1879, foram trazidas ao Brasil e levadas ao Rio Grande do Sul, por alemães, as abelhas *Apis mellifera ligustica*. Também foram introduzidas na região Sul a *Apis mellifera carnica* (CRANE, 1999). Os imigrantes europeus trouxeram outras subespécies o que contribuiu para disseminar as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (WIESE, 2005). Através de hibridação intraespecífica houve a criação de diferentes subespécies, fazendo com que essas abelhas se disseminassem pelo planeta, como no Continente Americano (PARKER et al., 2010).

Em 1956, houve a importação de rainhas e introdução da abelha africana *Apis mellifera scutellata*, com objetivo de aumentar a produtividade das colmeias. No ano seguinte, vinte e seis enxames de abelhas africanas escaparam e iniciaram o processo de cruzamento com as subespécies europeias, levando a origem de populações poli híbridas, atualmente

chamadas abelhas africanizadas (PEREIRA; CHAUD-NETTO, 2005; PINTO et al., 2005).

As condições climáticas e florísticas encontradas no Continente Americano foram favoráveis à adaptação das abelhas africanizadas, as quais dispersaram-se ao longo da América do Sul, da América Central, chegando então ao México em 1986 e à Califórnia em 1994 (MELLO et al., 2003).

2. Estrutura social das abelhas: a divisão de trabalho

Durante todo o ano, o enxame de abelhas *Apis mellifera* é composto por milhares de fêmeas estéreis, chamadas operárias, apresenta uma única abelha rainha, que é fértil, e também conta com a presença de algumas centenas de machos férteis, os zangões (FREE, 1980).

Todos os indivíduos da colônia passam pelos seguintes estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto. Permanecem três dias na fase de ovo e seis dias na fase de larva, independentemente da casta. No caso da fase de pupa, há variação em função da casta e da subespécie de abelha, durando aproximadamente sete dias para a rainha, quinze para os zangões e doze para as operárias, assim, respectivamente, rainha, zangões e operárias levam em torno de 16, 24 e 21 dias para completar seu ciclo de desenvolvimento do ovo ao nascimento (PAGE; PENG, 2001).

Quanto à divisão de tarefas, o zangão é responsável por fecundar a abelha rainha. A rainha, anatomicamente, é maior que a operária e pode viver por anos, sua responsabilidade é a manutenção da coesão do enxame. Após realizar o voo nupcial e copular com vários zangões ela permanece na colônia realizando diariamente a postura de milhares de ovos, garantindo o nascimento de novos indivíduos (FREE, 1980; WIESE, 2005).

Já as abelhas operárias vivem em torno de seis semanas e são responsáveis pela maioria dos trabalhos da colmeia (FREE, 1980), apresentando polietismo etário: do primeiro ao terceiro dia de vida fazem a limpeza de impurezas indesejáveis dentro da colmeia. Do quarto ao décimo segundo dia têm a função de nutriz, o que significa alimentar as larvas e rainha,

produzir geleia real e, caso necessário, providenciam a criação de novas rainhas. Do décimo terceiro ao décimo oitavo dia são operárias engenheiras, produzem a cera e constroem os favos. Do décimo nono ao vigésimo dia são guardiãs, ficam no alvado, a entrada do enxame, defendendo a colmeia contra invasores. Por último, a partir do vigésimo primeiro dia as abelhas operárias chamam-se campeiras e fazem serviços externos em campo, coletando pólen, néctar, resina e água, os quais são recursos de manutenção dos enxames e tornam-se produtos importantes para a produção apícola (WEISE, 2005; HICKMAN et al., 2010). Ao assumirem a tarefa de operária campeira e saírem para forragear, as abelhas ainda contribuem com o ambiente realizando a polinização, sendo o principal vetor de pólen em culturas comerciais (BALBUENA et al., 2015).

3. O papel dos polinizadores

As abelhas merecem papel de destaque não apenas por sua diversidade morfológica e comportamental, mas também por serem insetos que exploram grande variedade de tipos florais, o que é de extrema importância para as angiospermas cuja maioria de suas espécies tem flores visitadas e polinizadas, principalmente ou exclusivamente por abelhas. Como via de troca entre os agentes polinizadores bióticos, as abelhas dependem da coleta dos recursos florais para sua sobrevivência, tendo dessa forma, desenvolvido evolutivamente essa relação estreita de mutualismo com as angiospermas (PINHEIRO et al., 2014).

Ao forragear em busca de alimento, as abelhas operárias campeiras promovem a reprodução cruzada das plantas, cujos benefícios variam entre as culturas, como maior diversidade genética e maior quantidade e qualidade de frutos e sementes (COUTO; COUTO, 2002; BREEZE et al., 2011). Cerca de 75% das espécies vegetais dependem de agentes polinizadores como, por exemplo, água, vento e animais. Entretanto, as abelhas são consideradas os principais polinizadores, responsáveis por realizar a reprodução cruzada de 73% das espécies vegetais cultivadas mundialmente (RICKETTS et al., 2008).

Em 2005, o valor econômico mundial da polinização feita por insetos gerou em torno de 153 bilhões de euros, ou seja, 9,5% do valor total da produção agrícola mundial, demonstrando que a presença de polinizadores é indispensável para que haja produtividade (CHAMBÓ et al., 2010; POTTS et al., 2010). Cada vez mais, a agricultura carece da presença desses animais, isso pois a área cultivada com plantações polinizador-dependente aumentou. Se num futuro próximo esse tipo de cultivo continuar, em breve haverá aumento da necessidade, justamente, dos serviços dos polinizadores que estão em declínio (AIZEN et al., 2008).

Uma vantagem das abelhas melíferas é que grandes quantidades de enxames podem ser transportados e levados a diversas áreas, como plantações, ainda mais levando em consideração a altíssima ação das abelhas na polinização de campos agrícolas. As abelhas melíferas, especificamente, são muito ativas e coletam bastante pólen até mesmo durante o inverno, tendo assim, papel de destaque como polinizadora (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006). Elas têm se tornado ainda mais necessárias devido ao aumento de monoculturas e diminuição do número de abelhas nativas (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006). Ou seja, na ausência das abelhas, não só a vegetação nativa é prejudicada, mas também a produtividade de monoculturas.

Em determinadas regiões tem sido documentado o desaparecimento das abelhas *Apis mellifera*. Entre 1985 a 2005, na Europa, houve a perda de 25% das colônias de *Apis mellifera*, enquanto que nos Estados Unidos, entre os anos de 1947 a 2005, o número de perdas de colônias foi de 59%. Só na Espanha, as perdas foram de 80% nos últimos dez anos (BERNAL et al., 2010; POTTS et al., 2010).

4. Declínio das abelhas

Algumas perdas de enxames no inverno são normais; porém, como há variação na proporção de colônias morrendo a cada ano, é difícil dizer quando as perdas são parte de um processo contínuo natural ou de uma ação externa. O que está claro é que em média em um ano a cada dez, os apicultores têm sofrido perdas gravíssimas de seus enxames e isso já vem acontecendo há um

longo tempo (OLDROYD, 2007). Nos Estados Unidos, entre 2006 e 2007, houve perda de cerca de 45% das colmeias, uma síndrome que se caracteriza pela perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou proximidades da colmeia; porém há o abandono das crias e alimento no ninho, chamada Colony Collapse Disorder (CCD) ou Distúrbio de Colapso das Colônias (COX-FOSTER et al., 2007; VAN ENGELSDORP et al., 2009).

Muitos fatores estressantes, sozinhos ou em conjunto, podem estar enfraquecendo as colônias e associados ao declínio das abelhas *Apis mellifera*. Acredita-se que um único fator não pode ser responsável por todas as perdas ocorridas (PEREIRA, 2010). As causas podem ser: radiação emitida por telefones celulares; culturas geneticamente modificadas; queimadas e desmatamento de áreas com vegetação nativa para expansão de cidades, pecuária ou para áreas agrícolas, levando a perda do habitat das abelhas; nutrição inadequada; doenças causadas por vírus, bactérias e parasitas; e o uso indevido de práticas de cultivo, com abuso de agrotóxicos, o que é muito impactante para os polinizadores, especialmente em monoculturas (FLETCHER; BARNETT, 2003; FREITAS; PINHEIRO, 2010; RATNIEKS; CARRECK, 2010).

A prática agrícola com monoculturas acaba com muitas espécies de plantas nativas que são fontes de néctar, pólen, nidificação e reprodução dos insetos (FREITAS et al., 2009). Para Mullin et al. (2010) há associação entre a exposição das abelhas aos agrotóxicos e a ocorrência do Distúrbio de Colapso das Colônias e o declínio dos polinizadores. Isso porque o uso de agrotóxicos em monoculturas seleciona os indivíduos, havendo assim, o desenvolvimento de populações de pragas, ervas daninhas no caso de herbicidas, resistentes aos agrotóxicos frequentemente utilizados em seu combate. Por isso, há a utilização de produtos ainda mais tóxicos ou em doses mais altas, geralmente nocivos ao ambiente e aos polinizadores (PEREIRA, 2010).

Alguns trabalhos demonstram que há contaminação de abelhas durante o forrageamento de monoculturas, como exemplo, o caso apresentado por Krupke et al. (2012) no qual abelhas se expuseram de várias maneiras a pesticidas ao coletar recursos próximos a plantações agrícolas de milho nas quais as sementes foram tratadas com agrotóxicos. Até mesmo quando os

agrotóxicos são aplicados em cultivos não visitados pelas abelhas, ou longe de apiários, podem acabar contaminando recursos localizados distantes do local da aplicação ou, devido ao efeito residual, podem também permanecer em áreas tratadas por bastante tempo, atingindo organismos não alvo. Fato que acontece, inclusive, devido à pulverização aérea a qual com a ação do vento carrega os agrotóxicos a grandes distâncias, fenômeno chamado efeito deriva (PEREIRA, 2010).

Pesquisas relataram haver associação direta entre a exposição das abelhas aos agrotóxicos, a ocorrência do Distúrbio de Colapso das Colônias e conseqüentemente o declínio dos polinizadores. De uma forma mais detalhada a síndrome aconteceria, pois os agrotóxicos são capazes de interagir com patógenos da colmeia ou do ambiente que atingem a saúde das abelhas (VAN ENGELSDORP et al., 2009; JOHNSON et al., 2010; MULLIN et al., 2010).

O trabalho de Gregorc et al. (2012) mostra que quando as abelhas são expostas a agrotóxicos, se houver a presença do ácaro *V. destructor*, não há alteração de expressão de genes do sistema imunológico, relacionados ao reconhecimento de patógenos, o que torna as colônias mais suscetíveis a parasitas, doenças e abandono da colmeia. Já Mullin et al. (2010) observaram que colônias de abelhas expostas a agrotóxicos, apresentam alterações prejudiciais a sua organização social.

Uma forma de avaliar a toxicidade de determinadas substâncias às abelhas é por meio da determinação da dose letal média capaz de exterminar 50% de uma população, a DL₅₀ (PEREIRA, 2010). Protocolos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, OECD (1998) apresentam métodos oficiais de condução desses testes, nos quais agrotóxicos podem ser aplicados de forma tópica ou oral e a mortalidade registrada após 24 ou 48 horas após início da contaminação (PEREIRA, 2010).

Há contaminação aguda das abelhas quando os recursos provenientes de suas coletas apresentam concentrações de agrotóxicos superiores ou iguais a DL₅₀, o que causa a mortalidade em pouco tempo. Já as doses subletais, ou seja, inferiores a DL₅₀, quando nas colmeias, comprometem o bem-estar, produtividade e manutenção das colônias devido a mudanças fisiológicas e

comportamentais causadas nas abelhas (MIRANDA et al., 2003). Um fator agravante é que testes de estudo de risco para a liberação do uso de agrotóxicos consideram apenas a toxicidade aguda para as abelhas e não os efeitos que podem ser causados pela exposição a doses subletais. Esses efeitos são pouco conhecidos, principalmente a longo prazo, o que demonstra a necessidade de seus estudos (KEVAN, 1999; THOMPSON, 2003; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

5. Agrotóxicos

A agricultura hoje em dia é dependente do uso de agrotóxicos, pois a ocupação dos campos agrícolas por apenas uma espécie vegetal pode favorecer o aparecimento de pragas e doenças (COUTINHO et al., 2005), levando ao aumento no uso desses produtos. Por isso, há uma preocupação com a contaminação ambiental, ou seja, há aumento das concentrações de resíduos nos alimentos, no número de doenças associadas e na biomagnificação desses contaminantes nas teias alimentares (BASSIL et al., 2007).

O néctar coletado é transportado na vesícula melífera do inseto, processado pelas abelhas antes de se tornar mel e ser armazenado nos favos (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014), ou seja, a exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre por meio de contato direto, durante a coleta no campo ou na colônia por meio dos recursos armazenados, ou pela ingestão do néctar, mel e pólen com contaminantes. Todo esse processo leva a contaminação dos produtos apícolas e perturbações ou morte da colônia (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

O Brasil, em 2006, tornou-se o terceiro maior consumidor mundial de agrotóxicos, e em 2008 assumiu a liderança, acima dos Estados Unidos, tendo consumido 730 milhões de toneladas de agrotóxicos (LIRA, 2010; NOCELLI et al., 2010). Em 2011, as vendas de agrotóxicos aumentaram 10% em relação ao ano anterior devido ao uso em culturas de soja, cana, milho, algodão, café e pastagem, segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (2012). Dos agrotóxicos, houve aumento no consumo dos

herbicidas em plantações de cana-de-açúcar, soja, algodão, milho, feijão e pastagem; já dos inseticidas o aumento foi em culturas de soja, cana-de-açúcar, algodão, café e citros; e no caso dos fungicidas o aumento foi nas culturas de café, soja, algodão, trigo e feijão.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – foram lançadas 673,9 mil toneladas de produtos ativos no ambiente, sendo que em 2011, o consumo chegou a 853 mil toneladas, em média 12 litros/hectare (CARNEIRO et al., 2012). O Brasil também aumentou a área cultivada, na safra 2012/2013 foram 53,27 milhões de hectares, com produção de 186,86 milhões de toneladas de grãos e uso de um bilhão de litros de agrotóxicos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013; EMATER-RS, 2014).

Entre 2006 e 2012 houve um aumento de 72% na venda e utilização de agrotóxicos, com destaque para os herbicidas, os mais consumidos, seguido dos inseticidas, fungicidas e acaricidas (JARDIM; ANDRADE, 2009; SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA, 2012).

6. Herbicidas

6.1. Glifosato

O herbicida mais vendido no Brasil e no mundo devido a sua eficiência na eliminação de ervas daninhas é o glifosato. O volume de venda do glifosato formulado no Brasil está estimado em torno de 250 milhões de litros anuais (LONDRES, 2011). É um herbicida indicado no controle de ervas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja, pinus, eucalipto fumo, uva, ameixa, banana, cacau, nectarina, pera, pêssigo, seringueira, algodão e até ervas aquáticas (NORTOX, 2006).

Três tipos de glifosato têm sido comercializados desde 1971: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio e glifosato-trimesium, patenteados por empresas diferentes. Tanto como sal de amônio quanto sódio, o glifosato é um

herbicida organofosfato que não afeta o sistema nervoso como os outros organofosforados que são inseticidas, inibidores da enzima colinesterase (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é do grupo químico glicina substituída, se trata de um herbicida não-seletivo, pós-emergente, sistêmico (MONSANTO, 2008) de amplo espectro que se considera eficaz no controle de “pragas”, pouco tóxico e seguro para os usuários e meio ambiente (BATTAGLIN et al., 2005; EVANS et al., 2010; MAÑAS, 2010).

O herbicida normalmente é pulverizado nos cultivos, sendo absorvido através das folhas e caulículos novos e transportado por toda a planta. A forma ácida do glifosato reage para formar um sal solúvel em água que, ao ser transportado para o sistema radicular da planta, interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos necessários para a produção de proteínas vegetais e para a vida das plantas. Também age em algumas bactérias e fungos (SCHUETTE, 1998; BLACKBURN; BOUTIN, 2003; PEREZ et al., 2007; DILL et al., 2010).

Com o aumento do consumo de glifosato em todo o mundo, novos estudos demonstram que o uso intensivo do herbicida, favorecido inclusive, pelos cultivos transgênicos resistentes ao glifosato, pode ser a causa de efeitos prejudiciais à reprodução de organismos aquáticos, anfíbios e aves, assim como uma diminuição da diversidade de insetos, afinal, sabe-se que o uso do glifosato pode gerar resíduos que permanecem tanto na colheita quanto em animais usados na alimentação humana (RELYEA, 2005; EVANS et al., 2010, JONES et al., 2011).

O glifosato também já foi detectado na urina de fazendeiros que usaram o agrotóxico, assim como alguns estudos comprovam sua capacidade de inibir a produção de hormônios em homens ou o aumento da chance de partos prematuros e abortos em mulheres que foram expostas ao produto. Outros estudos apontaram a ação do glifosato na diminuição da produção espermática e aumento de tumores de fígado em ratos macho. Para invertebrados, encontrou-se efeito no crescimento de minhocas e até caracóis de água doce. Já com insetos, um estudo mostrou que joaninhas, *Coccinellidae*, também tiveram sua população reduzida para menos da metade (SPRINGETT; GRAY, 1992; TATE et al., 1997; COX, 2000; BYER, 2008). Sobre as *Apis mellifera*,

Herbert et al. (2014) mostraram que o aprendizado e a memória das abelhas diminuíram devido a exposição aguda ao glifosato e Balbuena et al. (2015) viram que níveis do herbicida encontrados em ambientes agrícolas prejudicam a capacidade de navegação das abelhas.

6.2. 2,4-D

O 2,4-D é um dos herbicidas mais antigos e utilizados nos Estados Unidos, desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial e conhecido como componente do agente laranja, amplamente utilizado para desfolhar regiões de selva pelo Reino Unido na Malásia e pelos militares dos EUA durante a Guerra do Vietnã. O grande problema do agente laranja foi a contaminação por dioxina dos herbicidas 2,4-D e 2,4,5-T, outro componente do produto, que leva a malformações e aumenta a chance de câncer em mamíferos. Atualmente, o 2,4-D ainda é um dos herbicidas mais utilizados a venda no mercado, mas já é fabricado por meio de um processo que não produz dioxina como contaminante. Já o 2,4,5-T não se pode produzir livre de contaminação por dioxinas, portanto desde 1983 sua venda é proibida nos Estados Unidos (TU; HURD; RANDALL, 2001).

O 2,4-D, ácido diclorofenoxiacético, é um herbicida seletivo de ação sistêmica, hormônio sintético que imita o hormônio do crescimento auxina, provocando crescimento descontrolado e morte em dicotiledôneas suscetíveis. A meia-vida do 2,4-D no ambiente é relativamente curta, dez dias em solos e menos tempo na água, mas pode ser mais longa em solos secos e frios nos quais a comunidade microbiana necessária está ausente dificultando sua degradação (TU; HURD; RANDALL, 2001).

No meio ambiente, a maioria das formulações se degradam na forma aniônica, solúvel em água, já as formulações de éster são tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos, mas as formulações de sal são para uso contra plantas aquáticas. O 2,4-D apresenta relativa baixa toxicidade para os animais, mas algumas formulações demonstraram causar danos oculares sérios. No entanto, até mesmo algumas culturas, como as uvas, são extremamente sensíveis a esse herbicida (TU; HURD; RANDALL, 2001).

Em relação as abelhas, após a aplicação do 2,4-D em dezembro de 1959, houve grave mortalidade, afetando centenas de colmeias em três apiários na região de Rotorua-Taupo, na Nova Zelândia. As abelhas foram encontradas rastejando na frente das entradas das colmeias e os enxames estavam extremamente fracos. Apesar da maioria dos enxames ter se recuperado, algumas abelhas estavam muito enfraquecidas para coletar a ponto de fazer reserva energética para o enxame, com isso, os apicultores estimaram perda de 35 toneladas de mel (ALMER-JONES, 1964).

Utilizado no controle de plantas daninhas de folhas largas, o 2,4-D costuma ser aplicado em soja, arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo e pastagens de gramíneas forrageiras (NORTOX, 2015). Uma variedade de herbicidas 2,4-D estão disponíveis no mercado por vários fabricantes. Por estar em uso há tanto tempo, muitos dos estudos sobre sua ação no ambiente são antigos, anteriores há 1980 (TU; HURD; RANDALL, 2001).

6.3. Associação entre herbicidas

Com o constante uso de agrotóxicos e aumento da resistência de várias espécies vegetais a esses produtos, para aumentar a eficiência na eliminação de ervas, utiliza-se glifosato misturado a outros herbicidas como os formulados à base de 2,4-D, terbutilazina, simazina, alaclor e diuron (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Esta associação, praticada por agricultores, é também alvo de estudo como nos trabalhos de Takano et al. (2013) e Osipe et al. (2017) ou então no trabalho de Ramos e Durigan (1996) que mostraram que a mistura pronta de glifosato com 2,4-D apresenta maior controle de plantas daninhas em relação aos produtos aplicados isoladamente, o que sugere a existência de sinergismo entre os dois produtos e também demonstra que há bastante tempo a associação desses dois herbicidas vem sendo recomendada e utilizada, levando a um questionamento da ação dos seus efeitos em conjunto para o meio ambiente e, no caso, para as abelhas *Apis mellifera*.

OBJETIVO

Dentro da problemática apresentada em relação ao impacto de herbicidas no meio ambiente, com ênfase em abelhas *Apis mellifera*, este trabalho teve como objetivos:

- Determinar a toxicidade (DL₅₀) dos herbicidas 2,4-D e glifosato para abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras.

- Avaliar a ocorrência de alterações comportamentais em abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras expostas por ingestão e contato às doses letal e subletal dos herbicidas 2,4-D e glifosato, de forma isolada e em associação.

REFERÊNCIAS

AIZEN, M. A. et al. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Curr. Biol.** v. 18, n. 20, p. 1572–1575, 2008.

ALMER-JONES, T. P. Effect on honey bees of 2,4-D. **N. Z. J. Agric. Res.**, v. 7, n. 3, p. 339-342, 1964. doi: 10.1080/00288233.1964.10416414.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **J. Exp. Biol.**, v. 218, p. 2799-2805, 2015.

BASSIL, K. L. et al. Cancer health effects of pesticides: systematic review. **Can. Fam. Physician**, v. 53, n. 10, p. 1704-1711, 2007.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams. **J. Am. Water Res. Assoc.**, v. 41, p. 323-332, 2005.

BERNAL, J. et al. Overview of pesticides in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, n. 6, p. 1964-1971, 2010.

BLACKBURN, L. G.; BOUTIN, C. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup®). **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1, p. 271-285, 2003.

BREEZE, T. D. Pollination services in the UK: how important are the honeybees? **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 142, p. 137-143, 2011.

BYER, J. D. et al. Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: an evaluation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, n. 16, p. 6052-6057, 2008.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 98 p.

CHAMBÓ, E. D. et al. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Rev. Bras. Agroecol.**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, décimo primeiro levantamento/agosto 2013. Brasília: Conab, 2013.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Rev. Toxicol. Meio Ambient.**, v.15, p. 65-72, 2005.

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

COX, C. Glyphosate factsheet: part 1 of 2. **J. Pestic. Reform.**, v. 108, n. 3, 2000. Disponível em: <<http://www.eastbaypesticidealert.org/Glyphosate%20Factsheet%201.htm>>. Acesso em: 18 set. 2017.

COX, C. Glyphosate factsheet: part 2 of 2. **J. Pestic. Reform**, v. 108, n. 3, p. 1-16, 2000. Disponível em: <http://www.sequoiaforestkeeper.org/Exhibit_B_Glyphosate_Ecological_Effects_2.pdf>. Acesso em: 18 set. 2017.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

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

DILL, G. M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V. K. (Ed.). **Glyphosate resistance in crops and weeds**: history, development, and management. Hoboken: Wiley, 2010. p. 1-33.

EMATER-RS. **Congresso Brasileiro de Agroecologia debate transgênicos e agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticia/197905/congresso-brasileirode-agroecologia-debate-transgenicos-e-agrotoxicos>>. Acesso em: 18 set. 2017.

EVANS, S. C.; SHAW, E. M.; RIPSTRA, A. L. Exposure to a glyphosate-based herbicide affects agrobiont predatory arthropod behavior and long-term survival. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1249-1257, 2010.

FLETCHER, M.; BARNETT, L. Bee poisoning incidents in the United Kingdom. **Bull. Insectol.**, v. 56, n. 1, p. 141-145, 2003.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Pais)**. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1980. 190 p.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the neotropics. **Apidologie**, v. 40, p. 332-346, 2009.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecol. Aust.**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.

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

GREGORC, A. et al. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). **J. Insect Physiol.**, v. 58, n. 8, p. 1042-1049, 2012.

HERBERT, L. T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **J. Exp. Biol.**, v. 217, p. 3457-3464, 2014.

HICKMAN JUNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 15. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2010. 842 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; DE JONG, D. (Ed.). **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting the best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. p. 75-88.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JOHNSON, R. M. et al. Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

JONES, D. K.; HAMMOND, J. I.; RELYEA, R. A. Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 30, p. 446-454, 2011.

KEVAN, P. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species activity and diversity. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 74, p. 373-393, 1999.

KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29268, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0029268.

LIRA, A. F. **Estudo da cinética de inibição anticolinesterásica por dialquilfosforamidatos**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011. 190 p.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 23, p. 303-309, 2006.

MAÑAS, F. **Efectos de glifosato sobre la salud**. Genotoxicidad de glifosato y su principal metabolito AMPA. Cuantificado por los ensayos de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y cometa. Bueno Aires: Globalízate, 2010.

MELLO, M. H. S. H.; SILVA, E. A.; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 237-241, 2003.

MIRANDA, J. E. et al. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **Plos One**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010

NOCELLI, R. C. et al. **Risco de pesticidas sobre as abelhas**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>>.

Acesso em: 19 set. 2017.

NORTOX 2,4-D. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob n. 03009. Arapongas: NORTOX, 2015. Bula. Disponível em: <http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/030302000000_13032015.pdf>. Acesso em: 18 set. 2017.

OECD. **Test no. 213**: honeybees, acute oral toxicity test. Paris: OECD Publishing, 1988. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070165-en>.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **PLoS Biol.**, v. 5, n. 6, p. e168, 2007. doi:10.1371/journal.pbio.0050168

OSIPE, J. B. et al. Spectrum of weed control with 2,4-D and dicamba herbicides associated to glyphosate or not. **Planta Daninha**, v. 35, p. e017160815, 2017.

PAGE JR., R.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp. Gerontol.**, v. 36, n. 4, p. 695-711, 2001.

PARKER, R. et al. Ecological Adaptation of diverse Honey Bee (*Apis mellifera*) populations. **PloS One**, v. 5, n. 6, p.1-12, 2010.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PEREIRA, A. M.; CHAUD-NETTO, J. Africanized honeybees: biological characteristics, urban nesting behavior and accidents caused in Brazilian cities (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 3, p. 535-550, 2005.

PEREZ, G. L. et al. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. **Ecol. Appl.**, v. 17, n. 8, p. 2310-2322, 2007.

PINHEIRO, M. et al. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R. et al. (Org.). **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. cap. 9, p. 205.

PINTO, M. A. et al. Africanization in the United States: replacement of feral european honey bees (*Apis mellifera* L.) by an african hybrid swarm. **Genetics**, v. 170, n. 4, p. 1653-1665, 2005.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends Ecol. Evol.**, v. 25, n. 6, p.345-353, 2010.

RAMOS, H. H.; DURIGAN, J. C. Avaliação da eficiência de uma mistura pronta de glyphosate mais 2,4-D no controle de *Commelina virginica* L. em citros. **Planta Daninha**, v. 14, n.1, p.33-41, 1996.

RATNIEKS, F. L. W.; CARRECK, N. L. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v. 327, p. 152, 2010.

RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecol. Appl.**, v. 15, p. 1118-1124, 2005.

RICKETTS, T.H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecol. Lett.**, v. 11, p. 499-515, 2008.

ROUNDUP ORIGINAL. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos**. São José dos Campos: Monsanto do Brasil Ltda, 2015. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-original-fispq.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees: a risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094482

SCHUETTE, J. **Environmental fate of glyphosate**. Sacramento: Environmental Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation, 1998. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. Uso de defensivos é intensificado no Brasil. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 22 set. 2017.

SPRINGETT, J. A.; GRAY, R. A. J. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Apporectodea caliginosa* in laboratory culture. **Soil Biol. Biochem.**, v. 24, p. 1739-1744, 1992.

TAKANO, H. K. et al. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Rev. Bras. Herbic.**, v. 12, p. 1-13, 2013.

TATE, T. M.; SPURLOCK, J. O.; CHRISTIAN, F. A. Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 33, p. 286-289, 1997.

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

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809 p.

TU, M; HURD, C.; RANDALL, J. M. **Weed control methods handbook: tools and techniques for use in natural areas**. Utah: Utah State University, 2001. 219 p. Disponível em: <<https://www.invasive.org/gist/products/handbook/methods-handbook.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

VAN ENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.

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

ZALUSKI, R. et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 34, p. 1062-1069, 2015.

Capítulo II

Glifosato e 2,4-D afetam a sobrevivência e deflagram alterações comportamentais em abelhas *Apis mellifera*

RESUMO

As abelhas têm grande importância na polinização; no entanto, o desaparecimento e morte de colônias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) têm aumentado em várias regiões do mundo, prejudicando a sobrevivência da espécie e a estrutura dos ecossistemas. O uso de agrotóxicos em cultivos agrícolas vem sendo apontado como um dos fatores responsáveis pela intensificação do desaparecimento das abelhas. No presente estudo, avaliou-se a toxicidade, as alterações comportamentais e motoras de abelhas campeiras de *A. mellifera* expostas aos herbicidas 2,4-D e glifosato, isolados ou associados, por testes de ingestão e contato. Para determinação da dose letal (DL₅₀) foi analisada a mortalidade de abelhas expostas a diferentes doses dos herbicidas por contato e ingestão por 24 horas. A atividade motora das abelhas expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e associação de ambos foi avaliada 4 e 24 horas após sua exposição utilizando caixa de observação comportamental. As DL₅₀ encontradas dos herbicidas glifosato e 2,4-D foram respectivamente: 273,93 e 127,70 µg/abelha para ingestão e 255,73 e 97,09 µg/abelha para contato. As doses subletais dos herbicidas glifosato e 2,4-D foram, respectivamente: 5,47 e 2,55 µg/abelha para ingestão e 5,11 e 1,94 µg/abelha para contato. A dose letal de 4 horas e subletal de 24 horas foram altamente tóxicas para as abelhas causando alterações locomotoras, as quais em campo podem influenciar o forrageamento das campeiras. Dos testes de doses subletais em 4h, foram significativos os de ingestão do 2,4-D e a associação dos herbicidas a qual demonstrou efeito aditivo. A associação dos herbicidas merece atenção, pois em campo essa combinação será tóxica as abelhas. Com este estudo, espera-se contribuir para a compreensão do efeito de herbicidas, assim como auxiliar no estabelecimento de medidas que reduzam a exposição de polinizadores a agrotóxicos prejudiciais.

Palavras-chave: abelhas, 2,4-D, glifosato, agrotóxico, herbicida, alterações motoras.

INTRODUÇÃO

Abelhas são de extrema importância ao meio ambiente, visto que exercem importante papel na área socioambiental, devido à produção apícola e à capacidade de polinização. Elas visitam vasta variedade de flores, sendo as abelhas *Apis mellifera* L. considerada a principal espécie polinizadora de culturas agrícolas no mundo (GALLAI et al., 2009). Grande parte da alimentação humana depende do trabalho realizado pelas abelhas, além de serem responsáveis pela reprodução cruzada de 73% das espécies vegetais cultivadas mundialmente (RICKETTS et al., 2008). Estima-se que o valor do trabalho realizado por esses insetos é superior a 216 bilhões de dólares anuais, considerando apenas a produção de culturas utilizadas diretamente na alimentação humana (GALLAI et al., 2009).

Apesar da sua importância, perdas de enxames em apiários e a redução da diversidade de abelhas nativas vêm ocorrendo mundialmente (OLDROYD, 2007; STOKSTAD, 2007; VAN ENGELSDORP; MEIXNER 2010; LU et al., 2012; KAPLAN, 2014), fato que representa ameaça a manutenção dos ecossistemas. Tal declínio foi denominado Distúrbio de Colapso das Colônias (CCD), sendo de 30% a 40% as perdas anuais das colônias de *Apis mellifera* (VAN ENGELSDORP et al., 2009; PETTIS; DELAPLANE, 2010).

Muitos fatores podem estar associados a esse declínio como a destruição de habitats, escassez de recursos florais, presença de patógenos e parasitas, mudanças climáticas e uso excessivo de agrotóxicos (OLDROYD, 2007; FREITAS et al. 2009; SOUZA, 2009; VAN ENGELSDORP et al., 2009; BERNAL et al., 2010; BROMENSHENK et al., 2010; JOHNSON et al., 2010; VAN ENGELSDORP; MEIXNER, 2010; DECOURTYE et al., 2011; CIARLO et al., 2012; CONNOLLY, 2013). Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas os mais utilizados na agricultura (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Os agrotóxicos são utilizados de forma preventiva ou curativa no combate a pragas em cultivos agrícolas, principalmente monoculturas. Os métodos de aplicação, como a pulverização foliar, permitem que agrotóxicos, herbicidas

no caso, sejam carregados para outras regiões externas a do plantio, além de contaminarem os recursos (néctar, pólen, resinas e água) coletados pelas abelhas durante suas atividades de forrageamento; levando essas substâncias contaminantes para dentro da colmeia (HERBERT et al., 2014; CONNOLLY, 2013; COLIN et al., 2004; GIESY et al., 2000).

Tais substâncias podem permanecer armazenadas nas colmeias por longos períodos, até que os recursos sejam utilizados pelo enxame (DEVILLERS; PHAM-DELÈGUE, 2002), gerando impacto negativo para os polinizadores e podendo ter relação direta com a ocorrência da CCD (PEREIRA, 2010; GILL et al., 2012), além de reduzir a produção de culturas que necessitam da polinização das abelhas.

A toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas é determinada por meio da dose letal capaz de ocasionar a mortalidade de 50% de uma população em um período de 24 ou 48 horas, a DL_{50} . Hoje em dia, os testes que permitem a liberação do uso de agrotóxicos consideram apenas a toxicidade aguda, sem levar em conta os prejuízos que podem ser decorrentes da exposição das abelhas a doses subletais, que são inferiores a DL_{50} . É importante destacar que o valor da DL_{50} pode variar devido a fatores como: idade das abelhas, variabilidade genética, variações climáticas locais e manipulação do pesquisador durante a execução dos testes (PEREIRA, 2010).

Recursos contaminados com doses subletais de agrotóxicos não ocasionam a mortalidade imediata das abelhas, contudo, se levadas e estocadas nas colmeias, podem gerar mudanças fisiológicas e comportamentais nos indivíduos, passando a prejudicar a sobrevivência individual e comprometendo o bem-estar, produtividade e manutenção das colônias (MIRANDA et al., 2003). Pesquisas recentes vêm demonstrando que doses subletais de agrotóxicos podem alterar a atividade enzimática, desenvolvimento, orientação, aprendizagem e imunidade em abelhas (ALAUX et al., 2010; BONCRISTIANI et al., 2012; WU et al., 2012). Assim, a avaliação dos riscos dos agrotóxicos para as abelhas baseada apenas na determinação da DL_{50} vem sendo contestada, devido à exposição contínua das abelhas a

doses subletais (RORTAIS et al., 2005), o que exige a avaliação da toxicidade crônica e de efeitos sinérgicos dessas substâncias.

Existem dois herbicidas que são utilizados em larga escala no Brasil: o 2,4-D e o glifosato. O ácido diclorofenóxiacético ou 2,4-D, pertence às auxinas sintéticas (mimetizador do hormônio auxina), apresentando rápida absorção foliar e movendo-se livremente pelo xilema e floema (NORTOX, 2006b). É um herbicida seletivo, sistêmico de pós-emergência que mata dicotiledôneas, e que provoca o crescimento descontrolado e a morte em plantas suscetíveis (TU; HURD; RANDALL, 2001). Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, o 2,4-D é um produto perigoso ao meio ambiente (Classe III), de classificação toxicológica I, ou seja, extremamente tóxico. Também é altamente móvel, apresentando alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir águas subterrâneas. É largamente utilizado nas culturas de trigo, soja, milho, arroz, aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café e pastagens de Braquiária (NORTOX, 2006b).

O segundo herbicida cujo uso aumentou amplamente nas últimas décadas é o glifosato, se tornando um dos agrotóxicos mais usados mundialmente (ZHANG et al., 2011). Sua aplicação costuma ser por pulverização, realizada para matar plantas daninhas nas culturas de café, citrus, cana-de-açúcar, algodão, arroz, milho, soja, pinus e eucalipto. O glifosato é transportado por toda a planta, atuando sobre a atividade enzimática, inibindo o metabolismo de aminoácidos; provocando amarelamento, murchamento, necrose e morte das plantas em até duas semanas. Em seu registro no MAPA, o glifosato tem Classificação Toxicológica IV, pouco tóxico, no entanto, sua classificação do potencial de periculosidade ambiental é nível III, sendo portanto, considerado como produto perigoso ao meio ambiente (NORTOX, 2006a; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014).

Dessa forma os polinizadores podem estar sendo expostos a doses maiores do que as encontradas em estudos anteriores e com outras metodologias, como as que avaliam as concentrações dos herbicidas

encontrados em corpos d'água (PERUZZO et al., 2008; SANCHÍS et al., 2011; MÖRTL et al., 2012; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014).

Também, a aplicação de um agrotóxico por vários anos consecutivos pode levar ao desenvolvimento de algumas espécies de plantas daninhas resistentes. Assim, em muitas culturas é feita a aplicação associada dos agrotóxicos, como é o caso dos herbicidas 2,4-D e glifosato, a fim de aumentar o controle das plantas daninhas (RAMOS; DURIGAN, 1996; AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Esse tipo de prática leva à necessidade de se conhecer quais os efeitos do uso de associação de herbicidas sobre as abelhas, pois essa atividade pode gerar maiores danos aos insetos.

Poucos estudos consideram a repetida exposição das abelhas a doses subletais de agrotóxicos, a existência de efeitos sinérgicos e alterações comportamentais causadas por tais substâncias, sendo assim, é importante conhecer o efeito dessas substâncias e estabelecer medidas que reduzam a exposição dos polinizadores a agrotóxicos. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivos determinar a toxicidade dos herbicidas 2,4-D e glifosato para abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras, além de avaliar a ocorrência de alterações comportamentais em abelhas *Apis mellifera* africanizadas adultas campeiras expostas por ingestão e contato à dose letal e subletal dos herbicidas 2,4-D e glifosato de forma isolada e em associação.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do Experimento

O projeto foi desenvolvido no Apiário da área de Produção de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Protocolo CEUA 0216/2016 – Anexo A), localizada na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Câmpus de Botucatu, cujas coordenadas geográficas são: 22°50'30"S; 48°25'41"O, com clima tipo Cfa (clima temperado úmido com verão quente) de acordo com a classificação de Köppen e altitude média de 623 metros.

Colheita das abelhas campeiras

Foram utilizadas abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras com mais de 20 dias de idade, coletadas de cinco colmeias localizadas no apiário da universidade. As abelhas campeiras que regressaram do campo foram coletadas pela manhã, utilizando caixa armadilha fixada no alvado (entrada do enxame) por aproximadamente 10 minutos (Figura 1). Em seguida as abelhas foram conduzidas ao laboratório e anestesiadas em freezer a -10°C por 1 a 2 minutos.



Figura 1: Caixa armadilha coletora de abelhas campeiras fixada no alvado da colmeia. Fonte: material elaborado pelo autor.

Testes de toxicidade

Duas formas de exposição foram usadas para avaliar a toxicidade: ingestão de xarope de mel contaminado e contato com os herbicidas em diferentes concentrações. Optou-se por produtos comerciais (Tabela 1), utilizados em campo, para preparar as doses a serem testadas para determinação da DL_{50} .

Para o 2,4-D e o glifosato foram preparadas soluções diluídas em água destilada, para todas as diluições utilizadas considerou-se apenas a quantidade de ingrediente ativo do 2,4-D e glifosato e não os ingredientes inertes. As soluções foram agitadas durante a preparação e antes da sua utilização para garantir que estivessem sempre com a concentração adequada.

Para determinar a toxicidade dos herbicidas 2,4-D e glifosato foram utilizadas doses determinadas em testes preliminares (Tabela 1). Nesses pré-testes, sempre que necessário, as concentrações sofreram alterações conforme a mortalidade dose-dependente observada. Para que os testes fossem válidos a mortalidade média para os controles não excedeu 5% da amostra no final dos testes.

Tabela 1: Grupos químicos dos herbicidas, nome comercial e doses utilizadas em μg /abelha nos testes de contato e ingestão.

Herbicida/ Grupo químico	Nome comercial/ Empresa	Contato (μg/abelha)	Ingestão (μg/abelha)
Glifosato (glicina substituída)	Roundup Original (Monsanto)	0; 150; 180; 210; 240; 270; 300	0; 150; 180; 210; 240; 270; 300
2,4-D (ácido ariloxialcanóico)	Campeon (Stockton- Agrimor do Brasil Ltda.)	0; 80; 90; 100; 110; 120	0; 90; 100; 110; 120; 130; 140; 150

A DL_{50} de ingestão foi determinada de acordo com metodologia descrita por Miranda et al. (2003), com modificações. Foram colocadas 10 abelhas campeiras em placas de Petri descartáveis com furos no topo e mantidas em temperatura ambiente em presença de luz (Figura 2). Foi fornecido 1 mL de alimento (50% xarope de mel e 50% água) em tubo de plástico (50 x 10 x 10 mm), contendo as diferentes doses do herbicida, suficiente para todas abelhas consumirem o necessário. O alimento foi contaminado de forma que cada abelha ao ingerir 50 μL , valor que corresponde ao volume médio da vesícula melífera deste inseto (THOMPSON; HUNT, 1999), consumisse totalmente as diferentes doses pré-determinadas dos herbicidas. Após coletadas, as abelhas permaneceram uma hora em jejum antes de iniciar os testes, a fim de garantir o consumo do alimento contaminado, cujo fornecimento durou três horas. Após esse período, verificou-se que o alimento contaminado foi consumido e forneceu-se xarope de mel não contaminado. As abelhas foram mantidas em estufa com temperatura entre $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.



Figura 2: Abelhas campeiras em placas Petri para serem expostas aos herbicidas. Fonte: material elaborado pelo autor.

Para determinação da DL_{50} por contato, as abelhas foram coletadas, anestesiadas e diretamente transferidas para placas de Petri descartáveis com furos na tampa. Em seguida receberam 2 μ L de solução de 2,4-D e glifosato no tórax, conforme as doses pré-determinadas, aplicadas com micropipeta automática. As abelhas receberam xarope de açúcar *ad libitum* durante todos os testes.

Para cada dose testada, foram utilizadas 10 abelhas e os testes realizados em quintuplicata. Abelhas que viessem a apresentar alterações comportamentais ou letargia anteriormente aos testes foram rejeitadas e substituídas por abelhas saudáveis. Decorridas 24h do início dos testes, o número de abelhas mortas em cada tratamento foi contabilizado e os resultados utilizados para determinar a DL_{50} .

Após a determinação da DL_{50} foi estipulada a dose subletal (DS – 1/50 DL_{50}) de cada herbicida. A coleta e exposição das abelhas às doses subletais para a realização dos testes de locomoção foi realizada utilizando-se mesma metodologia.

Testes de locomoção

A atividade motora das abelhas campeiras foi avaliada 4 horas após sua exposição por ingestão ou contato às doses letais e 4 e 24 horas para as doses subletais dos herbicidas, isolados ou associados. A coleta e exposição das abelhas foram realizadas utilizando os mesmos métodos descritos para os testes de toxicidade.

O teste de avaliação da atividade motora foi realizado de acordo com Zaluski et al. (2015), em uma caixa de observação de madeira (60 x 35 x 4 cm), com a parte frontal tampada por um vidro para permitir a visualização das abelhas. Internamente a caixa apresentava cinco divisões formando raias de 50 x 5 x 4 cm (Figura 3). As abelhas tratadas topicamente ou pela ingestão da DL₅₀ ou dose subletal foram liberadas individualmente nas raias. A caixa de observação permaneceu inclinada em 45° e na parte superior havia instalada uma lâmpada fluorescente para que as abelhas subissem em direção a luz devido a fototaxia positiva (LAMBIN et al., 2001), motivo pelo qual os testes precisaram ser realizados em ambiente com ausência de luz. Uma placa de vidro colocada na caixa após a marca de 50 cm impedia que as abelhas chegassem até a lâmpada. Simultaneamente foram liberadas cinco abelhas e anotado o tempo que estas levaram para percorrer 50 cm. Para cada dose testada foram utilizadas 10 abelhas tratadas e todos os testes foram realizados em triplicata, além do controle.



Figura 3: Caixa de observação de madeira para realização do teste de locomoção. Fonte: material elaborado pelo autor.

Forma de análises estatísticas dos resultados

A DL₅₀ de ingestão e contato com base na mortalidade por dose de ingrediente ativo utilizado foi calculada utilizando a Análise Probit com probabilidade máxima, usando o programa estatístico Minitab (MINITAB Inc, 2001). Os resultados dos testes de locomoção foram submetidos à análise de variância com o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações pareadas

com o teste de Dunn usando o programa SigmaStat (Versão 3.5, Systat Software Inc., São José, CA). Os resultados foram representados na forma de medianas e intervalos interquartis (Q1–Q3). A significância foi definida em $P < 0,05$ (ZAR, 2010).

RESULTADOS

A toxicidade dos herbicidas foi definida a partir das doses encontradas através de testes de contato e ingestão (Tabela 1) e utilizadas para determinar as doses letais e subletais que seriam aplicadas nos testes. As DL_{50} definidas dos herbicidas glifosato e 2,4-D foram respectivamente: 273,93 e 127,70 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para ingestão e 255,73 e 97,09 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para contato. Já as doses subletais (DS) definidas dos herbicidas glifosato e 2,4-D foram, respectivamente: 5,47 e 2,55 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para ingestão e 5,11 e 1,94 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ para contato.

Os resultados dos testes de locomoção mostraram que os herbicidas glifosato e 2,4-D causaram alterações significativas nas abelhas com base nas doses estudadas em comparação ao controle para os tempos de 4h da DL_{50} e 24h da DS, enquanto que para o tempo 4h da DS não houve alterações significativas quando comparado ao controle exceto para a DS de ingestão do 2,4-D e a DS de contato da associação dos herbicidas (Tabelas 2 e 3). Apenas a DS de contato da associação dos herbicidas glifosato mais 2,4-D apresentou efeito aditivo significativo (Tabelas 2 e 3).

Das doses subletais de 4h, houve diferença significativa entre 2,4-D e glifosato para ingestão, sendo o 2,4-D mais tóxico. Já nas 24h, houve diferença significativa entre o glifosato e o 2,4-D tanto para ingestão quanto para contato, na qual o glifosato demonstrou ser mais tóxico havendo assim uma inversão com o passar do tempo (Tabela 3).

Tabela 2: Medianas e intervalos interquartis (Q1–Q3) do tempo (segundos) gasto pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas para percorrer 50 cm, 4 horas após exposição por ingestão ou contato à DL₅₀ dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações.

Tratamento	Tempo (s) – 4h
Controle Ingestão	7,29 (5,52 – 8,85) a
DL₅₀ Ingestão Glifosato (273,93 µg/abelha)	12,30 (9,21 – 18,09)b
DL₅₀ Ingestão 2,4-D (127,70 µg/abelha)	15,23 (8,50 – 50,27)b
DL₅₀ Ingestão Associação	11,14 (6,42 – 21,63)b
Controle Contato	7,29 (5,52 – 8,85) a
DL₅₀ Contato Glifosato (255,73 µg/abelha)	11,61 (6,29 – 22,23)b
DL₅₀ Contato 2,4-D (97,09 µg/abelha)	17,08 (6,44 – 35,06)b
DL₅₀ Contato Associação	24,59 (12,15 – 36,56)b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre medianas (P<0,05) usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (n=30).

Tabela 3: Medianas e intervalos interquartis (Q1–Q3) do tempo (segundos) gasto pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas para percorrer 50 cm, 4 e 24 horas após exposição por ingestão ou contato à Dose Subletal (DS) dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações.

Tratamento	Tempo(s) – 4h	Tempo(s) – 24h
Controle Ingestão	6,37 (3,77 – 8,91)a	5,99 (4,50 – 7,41) a
DS Ingestão Glifosato (5,47 µg/abelha)	6,79 (4,30 – 8,40)ac	15,13 (9,81 – 21,62)bc
DS Ingestão 2,4-D (2,55 µg/abelha)	11,65 (6,79 – 20,33)bd	8,12 (6,03 – 11,72)bd
DS Ingestão Associação	8,35 (5,37 – 11,07)a	11,84 (7,96 – 19,86)b
Controle Contato	6,37 (3,77 – 8,91)a	5,99 (4,50 – 7,41) a
DS Contato Glifosato (5,11 µg/abelha)	7,21 (4,28 – 10,06)a	14,55 (8,35 – 21,54)bc
DS Contato 2,4-D (1,94 µg/abelha)	6,46 (2,83 – 12,29)a	7,71 (5,70 – 13,74)bd
DS Contato Associação	9,55 (6,82 – 12,63)b	12,27 (8,65 – 19,05)b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre medianas (P<0,05) usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (n=30).

DISCUSSÃO

Os resultados indicaram alta toxicidade dos herbicidas glifosato e 2,4-D para as abelhas *Apis mellifera* africanizadas. As abelhas sofreram influência negativa, ou seja, redução da atividade motora após a exposição por ingestão e contato às DL₅₀ e DS dos dois herbicidas, como mostram os testes nos quais as abelhas foram expostas ao glifosato e 2,4-D, ou a ambos, ao serem comparados aos grupos controle. Ingestão e contato apresentaram toxicidade semelhantes.

Segundo Johansen e Mayer (1990), os agrotóxicos que apresentam DL₅₀ inferior a 2µg/abelha são considerados altamente tóxicos às abelhas *A.*

mellifera, e corresponde aos trabalhos de Herbert et al. (2014) e Balbuena et al. (2015) que testaram 0,125, 0,250 e 0,500 µg/abelha. Neste trabalho os valores de concentrações subletais encontrados demonstraram-se acima de 2µg/abelha, pois foram definidos com base na DL₅₀ encontrada através dos testes de mortalidade, no entanto, mesmo assim foram observados efeitos tóxicos.

Além da letalidade, os agrotóxicos podem causar mudanças não muito nítidas, efeitos subletais, que afetam a estrutura social da colmeia podendo reduzir sua força e produtividade ou mesmo levar o enxame à morte aos poucos. São efeitos que ocorrem em níveis abaixo dos estimados como prováveis de ocorrer (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Alterações em uma ou mais funções das abelhas podem afetar seu forrageamento e comprometer sua sobrevivência (ALIOUANE et al., 2009). As atividades da colônia podem ser prejudicadas, pois se no momento da coleta de recursos os mesmos estiverem contaminados, as abelhas sofrerão exposição aos contaminantes também.

O comportamento de forrageamento pode ser afetado, pois como demonstrado, a atividade motora foi comprometida pelo contato ou consumo dos herbicidas. As abelhas apresentam-se lentas, o que poderia significar um retardo no retornar a colônia. Caso a contaminação seja por DL₅₀ as abelhas muitas vezes nem retornarão ao enxame, morrendo antes, porém quando contaminadas com DS, carregam os contaminantes consigo de volta.

Dentro da colônia, as milhares de abelhas estão em constante contato físico, é quando há a transferência de alimento, na qual um estímulo de contato das antenas auxilia na orientação da abelha (FREE, 1980). Realizando grooming, self-grooming e trofalaxia pode ocorrer a contaminação via contato e ingestão das outras operárias, zangões, crias e rainha.

Devido à contaminação, letargia e alterações comportamentais das abelhas, pode haver também mudanças na qualidade e quantidade do néctar coletado, de forma que pode afetar as atividades da colônia, como a ovipostura, criação da prole, secreção da cera e elaboração dos favos, portanto, a transferência de alimentos é uma forma de comunicação de

extrema importância (FREE, 1980), mas que pode levar ao declínio da colônia caso haja transporte de herbicidas para dentro do enxame.

Os testes de associação quando comparados com os tratamentos dos herbicidas glifosato e 2,4-D isolados não demonstraram efeito aditivo para a maioria, mas sim para a DS de contato em 4h, o que sugere que a associação possa oferecer maior risco do que estes herbicidas de forma isolada caso ocorra tal aplicação em campo, em especial para a dose subletal após pouco tempo de exposição.

No trabalho de Zhu et al. (2014) os autores observaram a associação de diferentes agrotóxicos; Coumafós, Clorotalonil, Fluvalinato e Clorpirifós; cujos efeitos aumentaram mais de duas vezes a mortalidade das larvas das abelhas, que mostraram ser menos resistentes do que as abelhas adultas. Tais dados refletem a importância de novos estudos considerando diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas e que também são necessários estudos com as doses letais dos herbicidas, mas principalmente as subletais. O trabalho também reforça que a associação do 2,4-D com o glifosato apresenta o potencial de impactar as populações de abelhas. Sendo assim, ao considerar-se o risco dos agrotóxicos para as abelhas, deve ser considerada a mistura desses produtos, conforme os costumes e indicações de aplicação em campo.

Em relação ao consumo, não houve diferença entre o xarope de mel puro e o contaminado por glifosato ou 2,4-D, o que sugere que não há efeitos repelentes ou anti-alimentares de ambos herbicidas para as abelhas, o que pode causar repetição na exposição das abelhas e acúmulo de recursos contaminados pelos herbicidas nas colmeias (PAREJA et al., 2011).

Já em relação ao teste de locomoção para a DS de 24h, tanto para ingestão quanto contato, observou-se que o glifosato apresentou diferença do 2,4-D, indicando uma maior efeito negativo sobre a atividade motora das abelhas e conseqüentemente podendo ser ainda mais tóxico quando se trata de causar distúrbios comportamentais. A avaliação da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas levando em conta, especialmente, os efeitos subletais contribui para melhor entendimento do declínio dos polinizadores,

favorecendo a adoção de estratégias que reduzam essa contaminação (HOOVEN et al., 2013).

Apesar de formulações comerciais dos agrotóxicos apresentarem ingredientes inertes que podem ser responsáveis por potencializar o efeito dos ingredientes ativos e, assim, ser tóxicos para as abelhas (CIARLO et al., 2012), neste estudo decidiu-se utilizar a formulação comercial dos herbicidas glifosato e 2,4-D, que são as utilizadas em campo, com a proposta de simular de forma mais real a exposição das abelhas a esses produtos no ambiente, assim como realizado em outros trabalhos (ZALUSKI, 2015).

Aparentemente, os agrotóxicos podem não oferecer riscos em testes de efeitos subletais em semi-campo e campo, devido a sua baixa toxicidade aguda oral e de contato ou baixas taxas de aplicação, mas que merecem atenção em laboratório pois podem apresentar efeitos significativos sobre a colônia como ruptura da divisão de trabalho, rejeição de abelhas operárias que retornam à mesma e alteração em outros tipos de comportamento. Se propõe que para os estudos de campo e semi-campo, observe-se níveis de orientação das abelhas operárias, limpeza do corpo, tremores, efeitos retardados, comportamento agressivo, níveis de atividade à entrada da colmeia, número de indivíduos, entre outros, além de sobrevivência ao longo do inverno ou seca (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Para Riedl et al. (2006), havia pouca probabilidade dos herbicidas causarem problemas às abelhas no campo já que seu modo de ação objetiva afeta vegetais e não animais. A baixa existência de literatura científica sobre as consequências biológicas de combinações de herbicidas argumenta a favor de mudanças urgentes nas políticas regulatórias de registro e monitoramento de agrotóxicos, levando em consideração a segurança de polinizadores. Assim, um banco de dados mais completo e realístico, considerando efeitos letais e subletais, em laboratório e campo, do impacto dos agrotóxicos, com destaque para os herbicidas, sobre os polinizadores poderá ser elaborado e fornecer subsídios para a avaliação de autorização do uso de produtos altamente tóxicos, visando reduzir os impactos ecológicos e econômicos dessas substâncias, além de estimular a indústria química a desenvolver produtos menos nocivos aos polinizadores. Os resultados desse estudo indicam que

esses herbicidas afetam não só a sobrevivência mas também o comportamento das abelhas, podendo contribuir com o declínio das colônias.

CONCLUSÃO

Os herbicidas glifosato e 2,4-D foram tóxicos, desencadeando alterações motoras em abelhas *A. mellifera* expostas por contato e ingestão, tendo efeitos tanto em doses letais quanto subletais.

REFERÊNCIAS

ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 774-782, 2010.

ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **J. Exp. Biol.**, v. 218, p. 2799-2805, 2015.

BERNAL, J. et al. Overview of pesticides residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, p. 1964-1971, 2010.

BINDRABAN, P. S. et al. **GM-related sustainability**: agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil. Wageningen: Plant Research International, Wageningen University, 2009. (Report n. 259).

BONCRISTIANI, H. et al. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v. 58, p. 613-620, 2012.

BROMENSHENK, J. J. et al. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. **PLoS One**, v. 5, p. e13181, 2010.

CIARLO, T. J. et al. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40848, 2012.

COLIN, M. E. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 47, p. 387-395, 2004.

CONNOLLY, C. N. The risk of insecticides to pollinating insects. **Commun. Integr. Biol.**, v. 6, p. e25074, 2013.

DECOURTYE, A. et al. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 429-437, 2011.

DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. **Honey bees**: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor & Francis, 2002.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Pais)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980. 190 p.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecol. Aust.**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010. doi: 10.4257/oeco.2010.1401.17.

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

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GLIFOSATO NORTOX WG. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob n. 02502. Arapongas: NORTOX, 2015. Bula. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/glifosatonortoxwg.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

HERBERT, L. T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **J. Exp. Biol.**, v. 217, p. 3457-3464, 2014.

HOOVEN, L.; SAGILI, R.; JOHANSEN, E. **How to reduce bee poisoning from pesticides**. Oregon: Oregon State University, Extension Service, 2013. Disponível em: <<http://wasba.org/how-to-reduce-bee-poisoning-from-pesticides-pnw-591/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

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

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection: a bee & pesticide handbook**. Cheshire: Wicwas Press, 1990.

JOHNSON, R. M. et al. Pesticides and honey bee toxicity-USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

KAPLAN, K. **Fact sheet: survey of bee losses during winter of 2012/2013 USA**. Washington: United State Department of Agriculture, 2014. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/br/bee/losses/index.htm>>. Acesso em: 17 dez. 2015.

LAMBIN, M. et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 48, p. 129-134, 2001.

LU, C.; WARCHOL, K. M.; CALLAHAN, R. A. In situ replication of honey bee colony collapse disorder. **Bull. Insectol.**, v. 65, p. 99-106, 2012.

MINITAB INC. **Minitab 13**. State College: Minitab Inc., 2001.

MIRANDA, J. E. et al. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.

MÖRTL, M. et al. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. **Microchem. J.**, v. 107, p. 143-151, 2013.

NORTOX 2,4-D. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob n. 03009. Arapongas: NORTOX, 2015. Bula.

Disponível em: <http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/030302000_000_13032015.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2015.

OLDROYD, P. B. What's killing American honey bees? **PLoS Biol.**, v. 5, p. e168, 2007.

PAREJA, L. et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, n. 10, p. 3844-3858, 2011.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PERUZZO, P.; PORTA, A.; RONCO, A. Levels of Glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environ. Pollut.**, v. 156, p. 61-66, 2008.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. S. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. **Apidologie**, v. 41, p. 256-263, 2010.

RAMOS, H. H.; DURIGAN, J. C. Avaliação da eficiência de uma mistura pronta de glyphosate mais 2,4-D no controle de *Commelina virginica* L. em citros. **Planta Daninha**, v. 14, n. 1, p. 33-41, 1996.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecol. Lett.**, v. 11, p. 499-515, 2008.

RIEDL, H. et al. **How to reduce bee poisoning from pesticides**. Corvallis, United States: Oregon State University, 2006. 26 p. (Pacific Northwest Extension, 591).

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.

RUIZ-TOLEDO, J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, D. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the

honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Acta Zool. Mex.**, v. 30, n. 2, p. 408-413, 2014.

SANCHÍS, J. et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 2335-2345, 2011.

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO RURAL, PESCA E COOPERATIVISMO. **VIII CBA - Transgênicos e agrotóxicos pautam debates**. Porto Alegre, 2013. Disponível em: <http://www.sdr.rs.gov.br/conteudo.php?cod_conteudo=4456&cod_menu=2>. Acesso em: 15 dez. 2015.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v. 316, p. 970-972, 2007.

THOMPSON, H. M.; HUNT, L. V. Extrapolating from honeybees to bumble bees in pesticide risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 147-166, 1999.

TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J. M. **Weed control methods handbook: tools and techniques for use in natural areas**. Utah: Utah State University, 2001. 219 p. Disponível em: <<https://www.invasive.org/gist/products/handbook/methods-handbook.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

VAN ENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, p. e6481, 2009.

VAN ENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 103, p. S80-S95, 2010.

WU, J. Y. et al. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 109, p. 326-329, 2012.

ZALUSKI, R. et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 34, p. 1062-1069, 2015.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2010. 944 p.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.**, v. 1, p.125-144, 2011.

ZHU, W. et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS ONE**. v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.

ANEXO A – Protocolo CEUA



ATESTADO

Atesto que o Projeto "EFEITO DE DOSES LETAIS E SUBLETAIS DE HERBICIDAS SOBRE A MORTALIDADE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE *Apis mellifera* L. " **Protocolo CEUA 0216/2016** , a ser conduzido por Juliana Sartori Lunardi, responsável/orientador Percília Cardoso Giaquinto, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	30/01/2017 a 28/07/2017
Nome Comum / Espécie / Linhagem	ABELHA / APIS MELLIFERA / Africanizada
Raça	Não se aplica
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	3000
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	15g
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 0 mes(es) e 20 dia(s).
Procedência	Apiário da FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 08/12/2016

PROF. ASS. DR. IBIARA CORREIA DE LIMA ALMEIDA PAZ
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/nº
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANEXO B – Manuscrito para a revista *Apidologie***Glyphosate and 2,4-D herbicides affect survival and trigger behavioral changes in
Apis mellifera honey bees****ABSTRACT**

Bees are very important for pollination, however, disappearance and death of *Apis mellifera* hives in many regions of the world has increased, damaging the species survival and ecosystems maintenance. The use of herbicides in agricultural crops has been accused as one of the factors responsible for this disappearance. This study aimed to evaluate the toxicity, behavioral and motor abnormalities on foraging honey bees *Apis mellifera* exposed to 2,4-D and glyphosate alone and combined. To determine the lethal dose (LD₅₀), bees were exposed to different herbicides doses by contact or ingestion and mortality was analyzed. After 24 hours, the mortality results were analyzed. The glyphosate and 2,4-D LD₅₀ found were, respectively: 273,93 and 127,70 µg/bee for ingestion and 255,73 and 97,09 µg/bee for contact. The sublethal doses for glyphosate and 2,4-D were, respectively: 5,47 and 2,55 µg/bee for ingestion and 5,11 and 1,94 µg/bee for contact. The bee's motor activity was assessed 4 and 24 hours after herbicides and combination exposure, using a behavioral observation box. The 24 hours lethal and sublethal doses were highly toxic to bees causing locomotors changes, which in the field can influence the bees foraging activity. Only the 4h sublethal herbicide association test showed additive effect, however this fact deserves attention because when carried to the colony, the herbicides can influence other bees behavior and cause weakening or even death of the hive.

Keywords: honey bees, 2,4-D, glyphosate, toxic pesticides, herbicides, motor changes.

INTRODUCTION

Bees are extremely important to the environment; they have an important role in the socio-environmental area due to bee production and pollination capacity. They visit a wide variety of flowers, being the *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) the main pollinating species of agricultural crops in the world (GALLAI et al., 2009). Most of the human diet depends of the bees pollinating work, who are responsible for the cross-breeding of 73% of the plant species cultivated worldwide (RICKETTS et al., 2008). It is estimated that the value of the work done by these insects exceeds 216 billion dollars per year, considering only the production of cultures used directly to human diet (GALLAI et al., 2009)

Despite their importance, losses of swarms in beekeeping area and reduction of native bees diversity have been occurring worldwide (OLDROYD, 2007; STOKSTAD, 2007; VAN ENGELSDORP; MEIXNER 2010; LU et al., 2012; KAPLAN, 2014), wich are a threat to the maintenance of ecosystems. This decline was called Colony Collapse Disorder (CCD), with annual losses of *Apis mellifera* colonies being 30% to 40% (VAN ENGELSDORP et al., 2009, PETTIS and DELAPLANE, 2010).

Many factors may be associated to this decline, such as habitats destruction, floral resources scarcity, pathogens, parasites, climate change and agrochemicals use (OLDROYD, 2007; FREITAS et al. 2009; SOUZA, 2009; VAN ENGELSDORP et al., 2009; BERNAL et al., 2010; BROMENSHENK et al., 2010; JOHNSON et al., 2010; VAN ENGELSDORP; MEIXNER, 2010; DECOURTYE et al., 2011; CIARLO et al., 2012; CONNOLLY, 2013). Nowadays, Brazil is the world's largest consumer of agrochemicals, being herbicides, insecticides, fungicides and acaricides the most used in agriculture (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Agrochemicals are used preventively or curatively in the fight against plagues in agricultural crops, mainly monocultures. Both the foliar spray and the seeds treatment with pesticides or other methods, allows the herbicide to be carried to places outside the crops, besides the contamination of resources collected by the bees during their foraging activities; (nectar, pollen, resins and water) which brings these contaminants into the hive (HERBERT et al., 2014; CONNOLLY, 2013; COLIN et al., 2004; GIESY et al., 2000).

These substances can remain stored in hives for long periods, until the resources are used by the swarm (DEVILLERS; PHAM-DELÈGUE, 2002), generating a negative impact on the pollinators, this may be directly related to the occurrence of CCD (PEREIRA, 2010; GILL et al., 2012), besides the production reduction of crops that requires bee pollination.

The agrochemicals toxicities to bees are set by the lethal dose, LD_{50} , capable of causing the mortality of 50% of a population in 24 or 48 hours. Nowadays, the tests that allows the agrochemicals use release only consider acute toxicity, without taking into account the damages that may be due to the the bees exposure to sublethal doses, which are lower than the LD_{50} . It is important to note that the LD_{50} value can vary due to factors such as: bee age, genetic variability, local climatic variations and the researcher manipulation during the execution of the tests (PEREIRA, 2010).

Resources contaminated with pesticides sublethal doses do not cause the immediate mortality of bees; however, if carried and stored in hives, they can generate physiological and behavioral changes in the individuals, which may affect individual survival and compromise the welfare, productivity and maintenance of colonies (MIRANDA et al., 2003). Recent researches have shown that pesticides sublethal doses

may alter enzyme activity, development, orientation, learning, and immunity in bees (ALAUX et al., 2010, BONCRISTIANI et al., 2012; WU et al., 2012). Thus, the agrochemicals risks evaluation for bees based only on the LD₅₀ determination has been contested, due to the continuous bees exposure to sublethal doses (RORTAIS et al., 2005), which requires these substances chronic toxicity and synergistic effects evaluation.

There are two herbicides that are widely used in Brazil: the 2,4-D and the glyphosate. Dichlorophenoxyacetic acid or 2,4-D belongs to synthetic auxins, exhibiting rapid leaf absorption and moving freely through xylem and phloem (NORTOX, 2006b). It is a selective herbicide, which kills dicotyledons and causes uncontrolled growth and death in susceptible plants (TU; HURD; RANDALL, 2001). Registered at the Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2,4-D is a hazardous product to the environment (Class III), considered extremely toxic. It is also highly mobile, presenting high potential for displacement in soil, so it can reach groundwater. It is widely used in crops of wheat, soybean, corn, rice, oats, sorghum, sugarcane, coffee and Braquiária pastures (NORTOX, 2006b).

The second herbicide, which has been widely used in last decades, is glyphosate, one of the most widely used agrochemicals in the world (ZHANG et al., 2011). Its application is usually by spraying, used to kill weeds in coffee, citrus, sugarcane, cotton, rice, corn, soybean, pine and eucalyptus crops. Glyphosate is transported throughout the plant, acting on the enzymatic activity, inhibiting the amino acids metabolism, causing yellowing, wilting, necrosis and death on plants in two weeks. Registered in the Ministério da Agriculultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, the glyphosate has a Toxicological Classification IV, slightly toxic, however, the environmental hazard

potential is level III, being therefore considered dangerous to the environment (NORTOX, 2006a; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014).

Thus pollinators may be exposed to higher doses than those found in previous studies and with other methodologies, such as those assessing herbicides concentrations found in water bodies (PERUZZO et al., 2008; SANCHÍS et al., 2011; MÖRTL et al., 2012; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014).

Also, the pesticide application for several consecutive years can lead to some resistant weed species development. Thus, in many crops the agrochemicals combined is applied in order to increase weed control, as it happens with 2,4-D and glyphosate, (RAMOS; DURIGAN, 1996; AMARANTE JUNIOR et al., 2002). This practice leads to the need to know the use of herbicide combination effects on bees, since this activity can generate greater damages to insects.

Few studies consider the bees repeated exposure to pesticides sublethal doses, the synergistic effects existence and behavioral changes caused by these substances, so it is important to know the effect of these substances and to establish measures that reduce the pollinators exposure to agrochemicals. Therefore, the present research had as objectives to determine the 2,4-D and glyphosate herbicides toxicity for foraging africanized *Apis mellifera* honeybees, in addition to evaluating behavioral changes occurrence in foraging africanized *Apis mellifera* honeybees exposed by ingestion and contact to lethal and sublethal doses of 2,4-D and glyphosate alone and in combination. Thus, it is expected to contribute to the understanding of the global decline of *Apis mellifera* honeybees colonies, that may be related to agrochemicals use.

MATERIAL AND METHODS

This project was developed in the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia beekeeping area (CEUA Protocol 0216/2016), located at the Lageado Experimental Farm, UNESP, Botucatu Campus, whose geographic coordinates are: 22 ° 50 '30 "S; 48 ° 25'41 "W, and 623 meters of average altitude.

Bee collection

Africanized *Apis mellifera* honeybees, with more than 20 days old, were collected from hives located in the university apiary. Foragers bees that returned from the field were collected in the morning, using a trap box fixed in the entrance of the swarm for approximately 10 minutes. Bees were taken to the laboratory and anesthetized in a freezer at -10°C for 1 to 2 minutes.

Toxicity tests

To assess toxicity two ways of exposure were used: contaminated honey ingestion and contact with different concentrations of herbicides. Commercial products used in the field, were chosen to prepare the doses to determine the LD₅₀. For 2,4-D and glyphosate, diluted solutions were prepared in distilled water, only the amount of active ingredient of 2,4-D and glyphosate was considered, not inert ingredients. The solutions were stirred during preparation and before use to ensure that they were always in the proper concentration.

To determine 2,4-D and glyphosate toxicities, doses determined in preliminary tests were used. When necessary, these concentrations have changed according to the dose-dependent mortality observed. For the tests to be valid the controls mean mortality did not exceed 5% of the sample at the end of the tests.

The LD₅₀ intake was determined according to a methodology described by Miranda et al. (2003), with modifications. Ten bees were placed in disposable Petri dishes with holes at the top and maintained at room temperature in the presence of light. 1 mL of food (honey syrup - 50%) was provided in a plastic tube (50 × 10 × 10 mm), containing the herbicide different doses. The food was contaminated so that each bee consuming 50µL, which corresponds to the mean volume of the honeybee's vesicle (THOMPSON; HUNT, 1999), completely consumes the predetermined different doses of the herbicides. After collected, the bees remained an hour unfed before starting the tests in order to guarantee the consumption of the contaminated food, whose supply lasted three hours. After this period the contaminated food consumption verified and uncontaminated honey syrup was supplied. The bees were kept in a greenhouse with a temperature between 28 ± 1 ° C and relative humidity of $70 \pm 10\%$.

To determine the contact LD₅₀, the bees were collected, anesthetized and directly transferred to disposable Petri dishes with holes in the lid. Then they received 2 µL of 2,4-D solution and glyphosate in the thorax, according to the predetermined doses, applied with automatic micropipette. The bees received sugar syrup *ad libitum* during all the tests.

For each tested dose, 10 bees were used and the tests performed five times. Bees that presented behavioral changes or lethargy prior to testing were rejected and replaced by healthy bees. Twenty-four hours after the tests start, the dead bees number in each treatment was counted and the results used to determine the LD₅₀. The glyphosate (Roundup) contact doses used to determine de LD₅₀ were: 0; 150; 180; 210; 240; 270; 300 µg/bee, and the ingestion doses were 0; 150; 180; 210; 240; 270; 300 µg/bee. For 2,4-D (Campeon) the contact doses used were 0; 80; 90; 100; 110; 120 µg/bee and the ingestion doses were 0; 90; 100; 110; 120; 130; 140; 150 µg/bee.

After the LD₅₀ determination, the sublethal dose (SD - 1/50 LD₅₀) of each herbicide was stipulated. Bee collection and exposure to sublethal doses for locomotion tests were performed using the same methodology.

Locomotion tests

Bee motor activity for ingestion or contact was evaluated 4 hours after lethal doses exposure 4 and 24 hours for sublethal doses of isolated or associated herbicides. The collection and exposure of bees were performed using the same methods described for the toxicity tests.

The motor activity test was performed according to Zaluski et al. (2015), in a wooden observation box (60 × 35 × 4 cm), with the front part capped by a glass to allow the view of the bees. Internally the box presents five divisions forming streaks of 50 × 5 × 4 cm. Bees treated topically or by ingestion with the LD₅₀ or sublethal dose were individually released into the streaks. The observation box remains inclined at 45° and in the upper part there is a fluorescent lamp so the bees can ascend towards the light due to positive phototaxis (LAMBIN et al., 2001), which is why the tests had to be performed in an environment with absence of light. A glass plate placed in the box after the 50 cm mark prevents the bees from reaching the lamp. Five bees were released simultaneously and the time it took to cover 50 cm was recorded. 10 treated bees were used for each dose tested and all the tests were performed in triplicate, besides the control.

Statistical analysis

The intake and contact LD₅₀ based on the mortality per dose of the used active ingredient was calculated using Probit Analysis with maximum probability, using the Minitab statistical program (MINITAB Inc, 2001). The locomotion tests results were submitted to variance analysis with the Kruskal-Wallis test, followed by comparisons matched with the Dunn test using the SigmaStat program (Version 3.5, Systat Software Inc., San Jose, CA). The results were represented as medians and interquartile ranges (Q1-Q3). Significance was defined as $P < 0.05$ (ZAR, 2010).

RESULTS

The herbicides toxicity was defined from doses found through contact and ingestion tests and used to determine the lethal and sublethal doses that would be applied in the tests. The LD₅₀ found for glyphosate and 2,4-D herbicides were: 273,93 and 127,70 μg / bee for ingestion and 255,73 and 97,09 μg / bee for contact, respectively. The glyphosate and 2,4-D sublethal doses (SD) were respectively: 5,47 and 2,55 μg / bee for ingestion and 5,11 and 1,94 μg / bee for contact.

For the LD₅₀ 4h period and the SD 24h period the locomotion tests results showed that the glyphosate and 2,4-D herbicides caused significant changes in honeybees based on the doses studied when compared to control. For the SD 4h period there were no significant changes when compared to the control except for the SD of intake and contact of 2,4-D and herbicides combination (Figure 1 and 2). Only the contact DS of glyphosate and 2,4-D combination had significant additive effect, the others did not present it (Figure 1 and 2).

For 4h sublethal doses, there was a significant difference between 2,4-D and glyphosate for ingestion, with 2,4-D being more toxic. At 24h, there was a significant difference between glyphosate and 2,4-D for both, ingestion and contact, in which glyphosate was shown to be more toxic and thus reversed over time (Figure 2).

DISCUSSION

The results indicated that glyphosate and 2,4-D herbicides have high toxicity for africanized *Apis mellifera* honeybees. The honeybees suffered a negative influence, that is, reduction of the motor activity after ingestion and contact exposure to the herbicides LD₅₀ and SD, as shown in the tests in which the bees were exposed to glyphosate and 2,4-D, or to both, when compared to the control groups. Ingestion and contact experienced similar toxicity.

According to Johansen and Mayer (1990), pesticides with LD₅₀ under than 2µg / bee are considered highly toxic to *A. mellifera* honeybees, and correspond to the works of Herbert et al. (2014) and Balbuena et al. (2015) who tested 0,125; 0,250 and 0,500 µg / bees doses. In this work the values of sublethal concentrations found were higher than 2µg / bee, since they were defined based on the LD₅₀ found through the mortality tests, however, even so, toxic effects were observed.

Besides the lethality, pesticides cause changes that are not very clear, sublethal effects that affect the beehives social structure and can reduce their strength and productivity or even bring the swarm gradually to death. They are effects that occur at levels below those estimated as likely to occur (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Changes in one or more of the bees' functions may affect their foraging and compromise their

survival (ALIOUANE et al., 2009). The colony activities can be harmed, because if at the time of collection the resources are contaminated, bees will be exposed to the contaminants as well.

Thus, the foraging behavior can be affected, because as demonstrated, the motor activity was compromised by the herbicides contact or consumption. The bees are presented lethargic, which could mean a delay in returning the colony. If the contamination is with the LD₅₀ the bees often will not return to the swarm, dying before, but when contaminated with SD, they carry the contaminants back with them.

Within the colony, thousands of bees are in constant physical contact, it is when food is passed from one worker to another, to drones and to the queen. In the food transfer the antennas present a contact stimulus that assists the bee's orientation (FREE, 1980), so the contamination by contact and ingestion happens to other workers, drones, hatchlings and queen.

Due to bee contamination, lethargy and behavioral changes there are also changes in the quality and quantity of the nectar collected, so that it can affect the colony activities such as oviposition, offspring creation, wax secretion and honeycomb elaboration. Food transfer is a form of communication of extreme importance (FREE, 1980), but it can lead to colony decline if there is herbicides transport into the swarm.

The association glyphosate and 2,4-D herbicides isolated tests when compared with treatments showed no additive effect, not for the majority, but for the 4h SD contact, suggesting that there may be a higher risk than the isolated herbicides, if the herbicides are applied together in the field, especially for the sublethal dose after a short time of exposure.

In their work, Zhu et al. (2014), observed the different pesticides association whose effects increased more than twice the bees' larvae mortality, in addition to that the larvae were less resistant than the adult bees. It reflects the importance of studies with the herbicides, their lethal doses, but mainly sublethal doses, and demonstrates that new studies on the subject are necessary considering different stages of bees development, but that, however, the 2,4-D and glyphosate combination has the potential to impact populations. Therefore, when considering the risk of pesticides for bees, the mixture of these products must be considered, according to the customs and field application indications.

In relation to consumption, there was no difference between pure honey syrup and that contaminated with glyphosate or 2,4-D, suggesting that there are no repellent or anti-food effects of both herbicides on bees, which can cause repetition in the bees exposure and accumulation of herbicide contaminated resources in hives (PAREJA et al., 2011).

Regarding the 24h SD locomotion test, both for ingestion and contact, it was observed that glyphosate presented a difference of 2,4-D, indicating a greater action on the bees motor activity and consequently being even more toxic when it comes to causing behavioral disorders. The agrochemicals toxicity evaluation bees, considering, especially, the sublethal effects, contributes to a better understanding of the pollinators decline, favoring the adoption of strategies to reduce this contamination (HOOVEN et al., 2013).

Although commercial formulations of pesticides have inert ingredients that may be responsible for potentiating the effect of the active ingredients and thus may be toxic to bees (CIARLO et al., 2012), in this study it was decided to use the commercial

formulation of herbicides glyphosate and 2,4-D, which are used in the field, with the proposal to simulate the exposure of bees to these products in the environment, as well as other studies (Zaluski, 2015).

Apparently, agrochemicals may pose no risk in sublethal effects tests in semi-field and field, due to their low acute oral and contact toxicity or low application rates, but that deserve attention in the laboratory, since they may have significant effects on the colony, as a breakdown of the division of labor, rejection of worker bees returning to it and change in other types of behavior. It is proposed that for field and semi-field studies that the bees' orientation levels, body cleansing, tremors, delayed effects, aggressive behavior, activity levels at the entrance to the hive, number of individuals, among others, besides survival during the winter or dry season are evaluated (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

For Riedl et al. (2006), herbicides were unlikely to cause problems to bees in the field since their mode of action is to affect plants rather than animals. It is precisely because of the scarce scientific literature on the biological consequences of herbicides combinations, which it argues in favor of urgent changes in the regulatory policies of pesticides registration and monitoring, taking into account the pollinators' safety. Thus, a more complete and realistic database, in laboratory and field, considering lethal and sublethal effects of pesticides impact, especially herbicides, on pollinators can be elaborated and provide subsidies for the authorization evaluation of the highly toxic products use, aiming to reduce these substances ecological and economic impacts, and stimulate the chemical industry to develop products less harmful to pollinators. The results of this study indicate that these herbicides affect not only the bee survival but also the behavior, and may contribute to the phenomenon of Colony Collapse Disorder.

CONCLUSION

Glyphosate and 2,4-D herbicides were toxic, triggering motor alterations in *A. mellifera* honeybees exposed by contact and ingestion, having effects both in lethal and sublethal doses. Due to the high toxicity of glyphosate and 2,4-D must be parsimony of use in agricultural crops, mainly in which bees collect resources and act as pollinators.

FIGURES

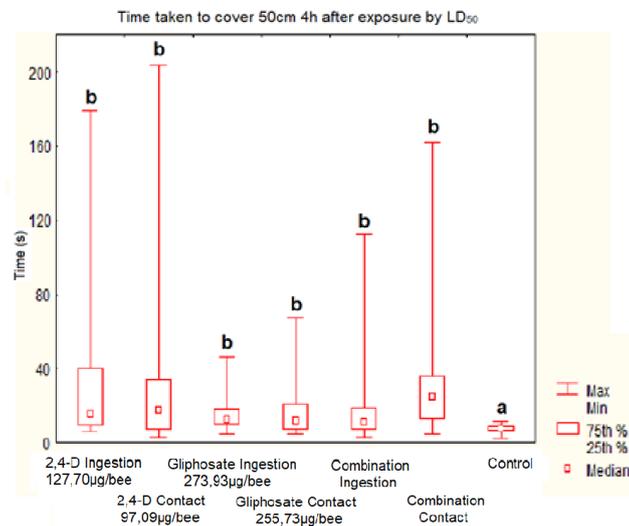


Figure 1. Median and interquartile intervals (Q1-Q3) of time (seconds) spent by africanized *Apis mellifera* honeybees to cover 50 cm, 4 hours after ingestion or contact exposure with the glyphosate, 2,4-D herbicides and their associations lethal dose (LD₅₀). Different lowercase letters indicate statistical difference between medians ($P < 0.05$) using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn test ($n = 30$).

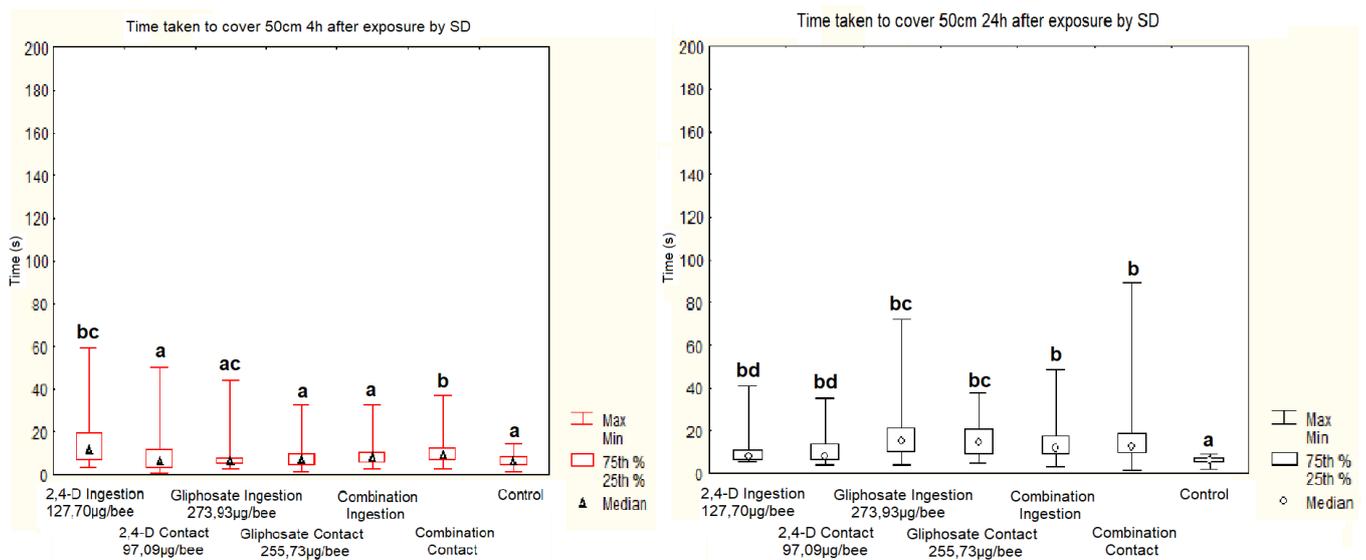


Figure 2. Median and interquartile intervals (Q1-Q3) of time (seconds) spent by africanized *Apis mellifera* honeybees to cover 50 cm, 4 and 24 hours after ingestion or contact exposure with the glyphosate, 2,4-D herbicides and their associations sublethal dose (SD_{50}). Different lowercase letters indicate statistical difference between medians ($P < 0.05$) using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn test ($n = 30$).

REFERENCES

ALAUX, C. et al. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 774-782, 2010.

ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **J. Exp. Biol.**, v. 218, p. 2799-2805, 2015.

BERNAL, J. et al. Overview of pesticides residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, p. 1964-1971, 2010.

BINDRABAN, P. S. et al. **GM-related sustainability: agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil.** Wageningen: Plant Research International, Wageningen University, 2009. (Report n. 259).

BONCRISTIANI, H. et al. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v. 58, p. 613-620, 2012.

BROMENSHENK, J. J. et al. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. **PLoS One**, v. 5, p. e13181, 2010.

CIARLO, T. J. et al. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40848, 2012.

COLIN, M. E. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 47, p. 387-395, 2004.

CONNOLLY, C. N. The risk of insecticides to pollinating insects. **Commun. Integr. Biol.**, v. 6, p. e25074, 2013.

DECOURTYE, A. et al. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 429-437, 2011.

DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. **Honey bees**: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor & Francis, 2002.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Pais)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980. 190 p.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecol. Aust.**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010. doi: 10.4257/oeco.2010.1401.17.

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

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GLIFOSATO NORTOX WG. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob n. 02502. Arapongas: NORTOX, 2015. Bula. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbidas/glifosatonortoxwg.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

HERBERT, L. T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **J. Exp. Biol.**, v. 217, p. 3457-3464, 2014.

HOOVEN, L.; SAGILI, R.; JOHANSEN, E. **How to reduce bee poisoning from pesticides**. Oregon: Oregon State University, Extension Service, 2013. Disponível em: <http://wasba.org/how-to-reduce-bee-poisoning-from-pesticides-pnw-591/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

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

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection: a bee & pesticide handbook**. Cheshire: Wicwas Press, 1990.

JOHNSON, R. M. et al. Pesticides and honey bee toxicity-USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

KAPLAN, K. **Fact sheet**: survey of bee losses during winter of 2012/2013 USA. Washington: United State Department of Agriculture, 2014. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/br/beelosses/index.htm>>. Acesso em: 17 dez. 2015.

LAMBIN, M. et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 48, p. 129-134, 2001.

LU, C.; WARCHOL, K. M.; CALLAHAN, R. A. In situ replication of honey bee colony collapse disorder. **Bull. Insectol.**, v. 65, p. 99-106, 2012.

MINITAB INC. **Minitab 13**. State College: Minitab Inc., 2001.

MIRANDA, J. E. et al. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.

MÖRTL, M. et al. Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. **Microchem. J.**, v. 107, p. 143-151, 2013.

NORTOX 2,4-D. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob n. 03009. Arapongas: NORTOX, 2015. Bula. Disponível em: <http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/030302000_000_13032015.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2015.

OLDROYD, P. B. What's killing American honey bees? **PLoS Biol.**, v. 5, p. e168, 2007.

PAREJA, L. et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, n. 10, p. 3844-3858, 2011.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PERUZZO, P.; PORTA, A.; RONCO, A. Levels of Glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environ. Pollut.**, v. 156, p. 61-66, 2008.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. S. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. **Apidologie**, v. 41, p. 256-263, 2010.

RAMOS, H. H.; DURIGAN, J. C. Avaliação da eficiência de uma mistura pronta de glyphosate mais 2,4-D no controle de *Commelina virginica* L. em citros. **Planta Daninha**, v. 14, n. 1, p. 33-41, 1996.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecol. Lett.**, v. 11, p. 499-515, 2008.

RIEDL, H. et al. **How to reduce bee poisoning from pesticides**. Corvallis, United States: Oregon State University, 2006. 26 p. (Pacific Northwest Extension, 591).

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.

RUIZ-TOLEDO, J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, D. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Acta Zool. Mex.**, v. 30, n. 2, p. 408-413, 2014.

SANCHÍS, J. et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 2335-2345, 2011.

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO RURAL, PESCA E COOPERATIVISMO.
VIII CBA - Transgênicos e agrotóxicos pautam debates. Porto Alegre, 2013.

Disponível em:
<http://www.sdr.rs.gov.br/conteudo.php?cod_conteudo=4456&cod_menu=2>. Acesso em: 15 dez. 2015.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais.** 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v. 316, p. 970-972, 2007.

THOMPSON, H. M.; HUNT, L. V. Extrapolating from honeybees to bumble bees in pesticide risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 147-166, 1999.

TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J. M. **Weed control methods handbook: tools and techniques for use in natural areas.** Utah: Utah State University, 2001. 219 p. Disponível em: <<https://www.invasive.org/gist/products/handbook/methods-handbook.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2017.

VAN ENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, p. e6481, 2009.

VAN ENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 103, p. S80-S95, 2010.

WU, J. Y. et al. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to Nosema (Microsporidia) infection. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 109, p. 326-329, 2012.

ZALUSKI, R. et al. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 34, p. 1062-1069, 2015.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2010. 944 p.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.**, v. 1, p.125-144, 2011.

ZHU, W. et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS ONE**. v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.