



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



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

**Efeito de herbicidas no comportamento e morfologia de  
abelhas *Apis mellifera* L.**

Juliana Sartori Lunardi

BOTUCATU – SP

2022

Juliana Sartori Lunardi

Efeito de herbicidas no comportamento e morfologia de abelhas *Apis mellifera* L.

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

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Percilia Cardoso Giaquinto

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

BOTUCATU – SP

2022

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 herbicidas no comportamento e morfologia de abelhas *Apis mellifera* L. / Juliana Sartori Lunardi. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Percilia Cardoso Giaquinto

Coorientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Capes: 20400004

1. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. 2. Abelhas.  
3. Glifosato. 4. Herbicidas.

Palavras-chave: 2,4-D; Abelhas; Glifosato; Herbicidas.

## **DEDICO**

Aos meus colegas de profissão e de laboratório e àqueles que um dia venham a se interessar e estudar o tema com a esperança de que este trabalho gere novas temáticas de pesquisa que levem a mais conhecimento sobre as abelhas, como entendê-las e preservá-las.

## **AGRADECIMENTOS**

À Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida (número da bolsa: 88882.180520/2018-01);

À professora Percilia Cardoso Giaquinto pelos vários anos de orientação desde o mestrado e por contribuir com o meu desenvolvimento profissional;

Ao professor Ricardo de Oliveira Orsi, pela coorientação e disponibilidade ao longo de todos esses anos, e por ter aceitado juntamente com a professora Percilia criar esse vínculo entre dois grupos de pesquisa por tantos anos;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Comportamento em Peixes e do grupo NECTAR, que já concluíram ou estão desenvolvendo seus estágios, Iniciações Científicas, TCCs e Pós-Graduação, agradeço imensamente por aceitarem minhas idas e vindas entre IB e Lageado e por toda ajuda com experimentos ainda mais durante a Pandemia de Covid.

Ao professor Luis Antônio Justulin Jr., do Setor de Morfologia do Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, por disponibilizar o laboratório para as análises de morfologia de glândulas;

Ao Instituto de Biociências e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, pela oportunidade de fazer parte do programa, 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 e técnicos do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva e Setor de Apicultura (FMVZ) e do setor de Setor de Morfologia e Fisiologia do Departamento de Biologia Funcional e Estrutural (IB) pelo auxílio prestado.

Ao Matheus pela paciência, fins de semana de experimento, marmitas no almoço e principalmente muita ajuda com referências e estatística. Agradeço também aos meus amigos e família pelo apoio.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS .....	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	10
CAPÍTULO 1 .....	11
INTRODUÇÃO GERAL .....	12
1. Abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	12
2. Principais ameaças para a manutenção das abelhas .....	14
3. A toxicidade de agrotóxicos para as abelhas .....	15
4. Herbicidas: glifosato, 2,4-D e associação .....	17
5. Importância das abelhas nutrizas para a colônia e efeitos de sua exposição a agrotóxicos .....	21
OBJETIVOS .....	23
REFERÊNCIAS .....	25
CAPÍTULO 2 .....	32
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	35
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAL E MÉTODOS .....	39
RESULTADOS .....	45
DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÃO .....	54
REFERÊNCIAS .....	55

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Comportamento higiênico (%) de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação. ....47
- Tabela 2.** Mortalidade semanal e total de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação. ....48
- Tabela 3.** Desenvolvimento populacional de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação. Valores de área (cm<sup>2</sup>) de cria aberta, cria fechada e de alimento. ....48
- Tabela 4.** Consumo do xarope de açúcar (mL) contaminado ou não com os herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação pelas colmeias de abelhas *Apis mellifera* L. ao longo de seis dias.....48
- Tabela 5.** Realeiras de abelhas *Apis mellifera* L. coletadas, número total e porcentagem (%) de rainhas emergidas das realeiras após exposição aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação.....49
- Tabela 6.** Morfometria de rainhas recém-emergidas de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação. Valores apresentados como média e intervalos interquartis (Q1-Q3).....49

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Média da área ( $\mu\text{m}^2$ ) e da altura ( $\mu\text{m}$ ) de glândulas mandibulares de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação em comparação ao controle. Os valores expressam as medianas seguidas dos intervalos interquartis (Q1-Q3). .....46

**Gráfico 2.** Média do número e média da área ( $\mu\text{m}^2$ ) de ácidos das glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação em comparação ao controle. ....47



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Glândula mandibular em *Apis mellifera*. (A) Esquema demonstrando a estrutura sacular da glândula mandibular (MdGld) e sua localização acima da mandíbula (Md) em vista lateral. (B) Células secretoras que formam o pseudoepitélio da glândula mandibular .....22
- Figura 2.** (Esq.) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (Dir.) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácino. Corados com Hematoxilina e Eosina. ....23
- Figura 3.** Asa anterior direita de abelha rainha *Apis mellifera* sinalizando a forma de medição do comprimento e largura. ....45

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

Esta tese será apresentada em dois capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral sobre a espécie a ser estudada, a problemática do uso de agrotóxicos e seus efeitos nas abelhas e os herbicidas escolhidos. O segundo capítulo apresenta o estudo do desenvolvimento populacional, mortalidade, comportamento higiênico de operárias e a morfologia de glândulas (considerando a sua importância para a alimentação das larvas e rainha), além da morfologia externa de rainhas. Deste capítulo será elaborado o manuscrito para submissão em revistas da área.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) originaram-se na África e espalharam-se para Ásia e Europa, evoluíram e se adaptaram em ambientes diversificados, com diferentes condições climáticas e recurso alimentar, o que favoreceu o surgimento de diferentes subespécies de abelhas melíferas (GUPTA, 2014). Há registros antigos do uso de produtos apícolas utilizados pelo homem, como pinturas rupestres na África e Espanha, de aproximadamente 6.000 a.C., indicando a extração de mel. Após muito tempo de exploração de colônias selvagens, iniciou-se o processo de criação e manejo de abelhas em colmeias fabricadas com diferentes materiais (argila, palha, madeira), como mostram registros no Egito Antigo e em outras regiões mediterrânicas datados de 1450 a.C. (CRANE, 1999).

No Brasil, a introdução de abelhas europeias ocorreu no século XIX e a existência da abelha *A. mellifera* africanizada, predominante no país atualmente, se deu por meio da introdução de abelhas africanas, na década de 50, via um programa para obtenção de híbridos que tivessem a mansidão das abelhas europeias e a produtividade das abelhas africanas (STORT; GONÇALVES, 1994). Houve cruzamentos das abelhas africanas com as linhagens europeias previamente introduzidas no Brasil que deram origem a abelhas com capacidade enxameatória, comportamento defensivo e produtividade altos, além de intensa atividade forrageira, resistência a doenças e boa adaptação a diferentes condições climáticas e geográficas (STORT; GONÇALVES, 1994).

As abelhas *A. mellifera* apresentam eussocialidade, um nível de organização social complexo entre os insetos que é caracterizado pelo compartilhamento do ninho, cuidado coletivo da prole, divisão social de trabalho em castas com indivíduos morfologicamente distintos e sobreposição de gerações (WILSON, 1971; DANFORTH, 2007). Uma colônia de *A. mellifera* é composta pela rainha, milhares de abelhas operárias e algumas centenas ou nenhum zangão. O número de abelhas operárias e de zangões depende das condições climáticas e dos recursos alimentares disponíveis (SEELEY, 1995; WINSTON, 2003). Todas as castas têm três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e pupa; permanecendo três dias na fase de ovo e seis dias na fase de larva. A fase de pupa varia em função da casta e da subespécie de

abelha, sendo cerca de sete dias para a rainha, quinze dias para os zangões e doze dias para as operárias. Portanto, o período de desenvolvimento da rainha, zangões e operárias é, respectivamente, de 16, 24 e 21 dias (PAGE; PENG, 2001; VAN VEEN, 2014).

Na colônia, a função da abelha rainha é a manutenção da coesão do enxame, realizando a cópula com zangões durante o voo nupcial e, posteriormente, a postura diária de milhares de ovos e óvulos. O zangão é responsável por fecundar uma abelha rainha. A casta mais numerosa é de abelhas operárias, as quais vivem por seis semanas e são responsáveis pela maior parte das tarefas de acordo com sua idade fisiológica (polietismo etário): nos primeiros três dias de vida realizam a limpeza interna da colmeia; do 4º ao 12º são denominadas nutrizes, produzem geleia real e alimentam as larvas e rainha; do 13º ao 18º dia produzem cera e constroem os favos; do 19º ao 20º protegem a colmeia de invasores e a partir do 21º dia as abelhas operárias são chamadas campeiras e fazem serviços externos coletando recursos como pólen, néctar, resina e água (SEELEY, 1995; WIESE, 2005).

Por meio da coevolução entre abelhas e plantas angiospermas ocorreu a diversificação e propagação desses grupos (DANFORTH, 2007; HU et al., 2008). Há cerca de 130 milhões de anos, com o surgimento das angiospermas, foi favorecida a mudança no hábito alimentar de diversos insetos, pois os grãos de pólen das flores passaram a ser consumidos como fonte principal de proteína, na qual insetos polinizadores contribuíam para a reprodução de diversas espécies vegetais e também tinham acesso a alimento por meio do pólen, surgindo, dessa forma, uma relação planta-inseto e conseqüentemente a coevolução de inúmeras espécies (MICHENER, 2007; RECH; AVILA-JUNIOR; SCHLINDWEIN, 2014), dentre elas as abelhas, as quais estima-se que existam mais de 40000 espécies, sendo mais de 25000 descritas (GUPTA, 2014).

Em todo o mundo, cerca de 90% das espécies de plantas possuem algum nível de dependência de agentes polinizadores bióticos (KLEIN et al., 2007). Em termos econômicos, a contribuição dos polinizadores nas principais culturas comercializadas é elevada, em torno de 1500 culturas são dependentes de insetos para a polinização no mundo, dessas espécies vegetais, 70% são utilizadas na alimentação humana (KLEIN et al., 2007).

A população de polinizadores tem diminuído, o que pode prejudicar diversas culturas agrícolas e também matas nativas. Ao considerar que a produção agrícola é dependente de polinizadores, considera-se também que as abelhas *A. mellifera* são indispensáveis, contribuindo com a produção de alimentos em todo o mundo, devido sua ampla distribuição, eficiência e possibilidade de manejo e transporte de colmeias (GARIBALDI et al., 2014; GOULSON et al., 2015; HANLEY et al., 2015; KLEIN et al., 2007).

## **2. Principais ameaças para a manutenção das abelhas**

Tem ocorrido nos últimos anos a redução global de polinizadores nativos e de abelhas melíferas manejadas e, entre as causas destacam-se: a fragmentação, desmatamento e queimada de áreas de vegetação nativa, mudanças climáticas, disseminação de doenças e parasitas, introdução de espécies exóticas e uso indiscriminado de agrotóxicos. Somados, esses fatores podem reduzir a diversidade e prejudicar a manutenção das populações de polinizadores ainda mais (BIESMEIJER et al., 2006; POTTS et al., 2010; ELLIS, 2012; BARTOMEUS et al., 2013; GOULSON et al., 2015; PAUDEL et al., 2015; FAO, 2016).

A intensificação da agricultura, pecuária e expansão das cidades geram a fragmentação e o desmatamento de áreas de vegetação nativa, ameaçando os ecossistemas e sua biodiversidade. Essas atividades reduzem a variedade de locais de nidificação e de recursos alimentares como néctar e pólen, necessários para os polinizadores (KREMEN et al., 2007). Apesar da ampla distribuição e potencial adaptativo das abelhas, as mudanças ambientais podem afetar o comportamento e a fisiologia (LE CONTE ; NAVAJAS, 2008), assim como o aparecimento e disseminação de novos parasitas e doenças ameaçam a manutenção dos polinizadores, como o ácaro *Varroa destructor*, ectoparasita que se alimenta da hemolinfa das abelhas adultas e de pupas e é responsável por transmitir viroses e prejudicar o sistema imune das abelhas (GAREDEW; SCHMOLZ ; LAMPRECHT, 2004; RAVOET et al., 2013).

Embora as abelhas venham sobrevivendo às mudanças climáticas, predadores, parasitas, doenças, entre outras alterações dos ecossistemas, os fatores apresentados até então têm influência na redução de polinizadores e, um dos mais preocupantes, é o uso excessivo de agrotóxicos. A introdução de moléculas tóxicas para controle de pragas e doenças em cultura agrícolas tem provocado contaminação

do ar, solo, águas superficiais e subterrâneas; e alterações na fauna e flora, afetando consequentemente os polinizadores (AKTAR, SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009; CARSON, 2010; LE CONTE; NAVAJAS, 2008; PARKER et al., 2010).

### **3. A toxicidade de agrotóxicos para as abelhas**

A produção de substâncias químicas sintéticas começou na Segunda Guerra Mundial, em seguida houve investimento em pesquisa e desenvolvimento de moléculas que poderiam ser usadas na agricultura e pecuária para controle de pragas, plantas daninhas, doenças e parasitas (CARSON, 2010). No mundo, por ano, aproximadamente quatro milhões de toneladas de agrotóxicos são aplicados (IPPOLITO et al., 2015).

No Brasil, o cenário é preocupante, pois desde 2008 o país é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, atualmente mais de 430 ingredientes ativos e 1400 formulações de agrotóxicos estão autorizados para uso pelo Ministério da Saúde e Ministério do Meio Ambiente e registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Dos 50 produtos mais utilizados no país 22 são proibidos na União Europeia, entre 2000 e 2012 houve aumento de 162% de toneladas na venda de agrotóxicos no Brasil (CARNEIRO et al., 2015). Em 2017, do consumo de pesticidas no Brasil, cerca de 27% foi com inseticidas e 35% foi de herbicidas, a venda dos dois juntos correspondeu a 370,117.38 toneladas de ingredientes ativos (IBAMA, 2017).

Para controle de determinadas pragas é comum as áreas agrícolas serem tratadas com diferentes agrotóxicos, com uso de misturas de diferentes produtos e aplicações repetidas. Aplicação de agrotóxicos em condições climáticas inapropriadas (vento, deriva), doses altas, equipamentos desregulados, pulverização aérea ou foliar, o tratamento de sementes com agrotóxicos ou outros métodos podem contribuir para que o produto seja carregado para regiões externas a do plantio ( BIRD; ESTERLY; PERRY, 1996; CONNOLLY, 2013; DAMALAS, 2015), além de contaminarem os recursos (néctar, pólen, resinas e água) coletados pelas abelhas durante o forrageamento, levando, inclusive, esses contaminantes para dentro da colmeia (COLIN et al., 2004).

As abelhas melíferas realizam vários voos em busca de néctar, pólen, água e resinas para realizar estoques de alimento para períodos de escassez. Elas coletam a mais de 9,5 km das colmeias e por apresentarem essa capacidade de forrageamento, estão suscetíveis à exposição a agrotóxicos utilizados em campo, podendo coletar e acumular recursos contaminados presentes em grande área (BEEKMAN; RATNIEKS, 2000; DEVILLERS, 2002). Essa exposição via coleta de recursos contaminados é uma possível forma de contaminação por contato indireto ou ingestão, já quando as abelhas forrageiam em uma área durante a aplicação de um agrotóxico elas podem ser expostas por contato direto (RENZI, 2013; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Além disso, essas substâncias podem permanecer armazenadas nas colmeias por longos períodos, até que os recursos sejam utilizados pela colônia (DEVILLERS; PHAM-DELÈGUE, 2002; GILL et al., 2012).

A  $DL_{50}$  (Dose Letal Média) é um dos parâmetros utilizados na determinação da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas, por meio da avaliação da quantidade de um ingrediente ativo capaz de matar 50% da população por ingestão ou contato de um produto dentro do período de 24 ou 48h (DEVILLERS, 2002). Através da definição da  $DL_{50}$  é possível calcular o quociente de risco para a exposição das abelhas por contato e ingestão em campo. Dependendo do valor, diferentes testes podem ser solicitados, como testes de resíduos em folhagem, testes em gaiolas para observar a mortalidade e comportamento das abelhas, testes em túneis e em campo para avaliar os efeitos sobre as colônias (DEVILLERS, 2002). Os resultados desses testes podem auxiliar a definir doses e intervalos de aplicação dos ingredientes ativos ou se a aplicação dos agrotóxicos durante a floração de culturas deve ser proibida.

Doses subletais (inferiores a  $DL_{50}$ ) de agrotóxicos podem alterar a atividade enzimática, desenvolvimento, orientação, aprendizagem e imunidade em abelhas (ALAUX et al., 2010; WU et al., 2012). Devido à exposição contínua das abelhas a doses subletais, a avaliação dos riscos dos agrotóxicos para as abelhas baseada apenas na determinação da  $DL_{50}$  pode ser contestada (RORTAIS et al., 2005), pois apesar da  $DL_{50}$  ser um parâmetro importante para demonstrar a toxicidade aguda dos agrotóxicos para as abelhas, esses testes não consideram os efeitos da exposição das abelhas a doses subletais, sua exposição repetida a esses produtos e os efeitos das interações desses agrotóxicos (CLUZEAU, 2002; PISA et al., 2015).



Ao longo do seu desenvolvimento e vida adulta, as abelhas são expostas a diversos agrotóxicos em doses subletais (MULLIN et al., 2010; KRUPKE et al., 2012; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Recursos contaminados com doses subletais de agrotóxicos não causam contaminação aguda das abelhas e mortalidade em curto espaço de tempo, contudo, se levados e estocados nas colmeias, com exposição crônica às doses subletais podem gerar mudanças fisiológicas, bioquímicas, neurológicas e comportamentais nos indivíduos, passando a prejudicar a sobrevivência individual e comprometendo o bem-estar, produtividade e a manutenção das colônias (MIRANDA et al., 2003; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014).

#### **4. Herbicidas: glifosato, 2,4-D e associação**

Atualmente, o Brasil está no ranking mundial dos maiores consumidores de agrotóxicos, sendo os herbicidas os mais utilizados em culturas agrícolas tanto no país como no mundo, representando 50% do valor total de agrotóxicos, seguido pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas (JARDIM; ANDRADE, 2009; CARNEIRO et al., 2015). Os inseticidas estão relacionados aos maiores prejuízos causados aos polinizadores, no entanto, os demais agrotóxicos também podem apresentar efeitos negativos (CLUZEAU, 2002), inclusive, os herbicidas já foram classificados como seguros para as abelhas, mas recentemente, pesquisas demonstram que seu uso intensivo e prolongado reduz a diversidade de plantas que fornecem néctar e pólen para as abelhas, a capacidade cognitiva das abelhas também pode ser prejudicada, o que compromete o retorno das mesmas às colmeias (HALD, 1999; HYVONEN; SALONEN, 2002; BALBUENA et al., 2015; GOULSON et al., 2015).

Existem dois herbicidas que são utilizados em larga escala no Brasil: o glifosato e o 2,4-D. O glifosato, embora já proibido em certos países, é um dos agrotóxicos mais usados mundialmente e o ingrediente ativo mais vendido no Brasil (ZHANG et al., 2011; IBAMA 2019). Sua aplicação é realizada para matar plantas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas principalmente nas culturas de café, citrus, cana-de-açúcar, algodão, arroz, milho, soja, pinus, eucalipto, entre outras. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o glifosato tem Classificação Toxicológica IV, pouco tóxico; no entanto, sua classificação do potencial de periculosidade ambiental é nível III, sendo, portanto, produto perigoso ao meio ambiente. 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. (NORTOX, 2015; RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014).

O glifosato inibe a 5-enolpiruvilshikimic-3-fosfato sintase (EPSPS), na via do chiquimato, causando redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, o que interrompe a produção de metabólitos aromáticos essenciais, (DOSSELAERE; VANDERLEYDEN, 2001). Um déficit de aminoácidos aromáticos leva a uma redução na síntese de proteínas e, conseqüentemente, à morte do organismo. Todas as plantas e alguns microrganismos contêm uma via funcional do chiquimato sendo, portanto, potencialmente suscetíveis ao glifosato, dessa forma o glifosato só pode ser usado em culturas geneticamente modificadas que carregam uma versão tolerante de EPSPS (FUNKE et al., 2006).

O herbicida já foi detectado na urina de fazendeiros que o utilizaram, além disso, alguns estudos expõem sua capacidade de inibir a produção de hormônios em homens e aumento da chance de partos prematuros e abortos em mulheres. Em ratos, o glifosato causou diminuição da produção espermática e aumento de tumores no fígado (BYER, 2008). Há estudos sobre seu efeito no crescimento de minhocas e caracóis, e também na redução da população de joaninhas, Coccinellidae (SPRINGETT; GRAY, 1992; TATE et al., 1997).

Em abelhas *A. mellifera*, o glifosato induz a morte celular no intestino médio de larvas criadas em incubadora, o herbicida também altera os níveis de expressão de algumas proteínas de armazenamento larval, genes desintoxicantes e genes imunes (GREGORC; ELLIS, 2011; GREGORC et al., 2012; VAZQUEZ et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2020). Crias de *A. mellifera* que receberam alimento contaminado exibiram duração mais prolongada de estágios larvais iniciais, larvas com peso reduzido e muda retardada (VAZQUEZ et al., 2018).

O glifosato também exerce efeitos adversos sobre o comportamento e o estado fisiológico de abelhas adultas, afetando a memória, aprendizado e a capacidade de navegação das abelhas (HERBERT et al., 2014; BALBUENA et al., 2015). A exposição crônica ao herbicida impacta negativamente a comunidade bacteriana do intestino médio de abelhas recém-emergidas e leva à formação de antenas

deformadas em operárias recém-emergidas (DAI et al., 2018; TOME et al., 2020). O nível ambiental de glifosato afeta a microbiota intestinal de operárias adultas e torna as operárias adultas jovens de *A. mellifera* mais suscetíveis à bactéria *Serratia marcescens* (MOTTA et al., 2018; ZHAO et al., 2020).

Já o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida da classe do ácido fenoxiacético, amplamente utilizado desde a década de 1940 em todo mundo e o segundo agrotóxico mais vendido no Brasil. Isso devido ao seu baixo custo, seletividade, eficácia, amplo espectro de controle de plantas daninhas e sua alta solubilidade em água, resultando em rápida penetração através das folhas/raízes tornando-o mais eficaz (ISLAM et al., 2018).

O 2,4-D, pertence às auxinas sintéticas (mimetizador do hormônio auxina), apresentando rápida absorção foliar e movendo-se livremente pelo xilema e floema (NORTOX, 2015). 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). É comumente utilizado nas culturas de trigo, soja, milho, arroz, aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café, pastagens de Braquiária entre outras (NORTOX, 2015; FREITAS et al., 2019). O herbicida 2,4-D é um dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais utilizados em plantações de cana-de-açúcar no Brasil (CHRISTOFOLETTI et al., 2017; CONAB, 2017; IBAMA, 2019).

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. Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), classificou o 2,4-D como agente possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2015).

Os efeitos ambientais e em diferentes organismos do 2,4-D são reportados em diversos trabalhos. O herbicida pode ser tóxico para pele, olhos e trato respiratório e gastrointestinal em humanos (ELLENHORM et al., 1997) e seu uso está associado a alterações endócrinas, toxicidade reprodutiva, neurotoxicidade, danos no fígado e rins em humanos, peixes e anfíbios (COLBORN; VOM SAAL; SOTO, 1994; ARONZON et

al., 2011; DE CASTRO MARCATO; DE SOUZA; FONTANETTI, 2017), além de vários efeitos tóxicos em espécies de oligoquetas como *Eisenia fetida* e *Eutyphoeus waltoni* (CORREIA; MOREIRA, 2010; SINGH; SINGH, 2015). A exposição crônica ao 2,4-D também retardou a metamorfose e inibiu o crescimento de girinos (FREITAS et al., 2019), além de reduzir a reprodução da espécie neotropical de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* (SILVA et al., 2020).

Há também efeitos em diversos insetos (CORREIA; MOREIRA, 2010; PARK et al., 2010), como declínio em populações de escaravelhos (MARTINEZ; LUMARET; CRUZ, 2001), efeito no tempo de desenvolvimento e queda da população larvas de joaninhas macho (*Coleomegilla maculata*) (FREYDIER; LUNDGREN, 2016), redução na mobilidade, além de alta mortalidade de cupins (*Macrotermes bellicosus*) e também redução na esclosão de ovos de abelhas *A. mellifera* (MORTON; MOFFETT; MACDONALD, 1972; EJOMAH; UYI, 2020).

Um herbicida quando aplicado por vários anos consecutivos pode levar à resistência de algumas espécies de plantas daninhas, por isso, em muitas culturas é feita a aplicação associada de herbicidas, a fim de aumentar o controle, além de menores custos quando feita a aplicação conjunta (RAMOS; DURIGAN, 1996; AMARANTE JUNIOR et al., 2002). O 2,4-D é frequentemente combinado com outros herbicidas em misturas comerciais (MURSCHELL; FARMER, 2019), como o glifosato, por exemplo.

A aplicação de misturas de substâncias tóxicas é uma estratégia comumente utilizada para reduzir gastos, controlar e prevenir a resistência de plantas daninhas, apesar dos potenciais efeitos que a mistura pode exercer em organismos não-alvo. Sabe-se que misturas de diferentes compostos podem causar mudanças complexas que são diferentes dos efeitos tóxicos exercidos pelos compostos individualmente (COX; SURGAN, 2006; RUIZ DE ARCAUTE et al., 2014; LEBLANC; WANG, 2006; VARONA-URIBE et al., 2016; ZALUSKI et al, 2017).

A mistura de substâncias tóxicas pode exercer interações entre seus componentes, incluindo aditividade, sinergismo e antagonismo (BRODEUR et al., 2014; DE ARCAUTE, 2018). Portanto, é necessário avaliar os efeitos conjuntos de

misturas e conhecer os efeitos da associação de herbicidas sobre as abelhas, pois tais interações podem gerar maiores danos aos insetos.

## **5. Importância das abelhas nutrizas para a colônia e efeitos de sua exposição a agrotóxicos**

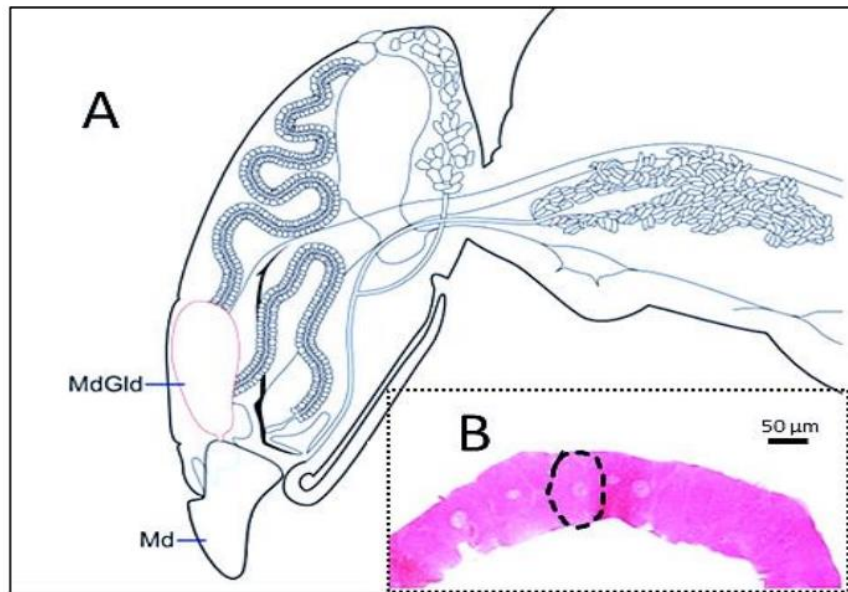
As abelhas nutrizas, por consumirem bastante pólen nos primeiros dias de vida, correm risco de serem expostas a produtos coletados e contaminados (RORTAIS et al., 2005; HALM et al., 2006). É durante a fase de nutrizas que há alta produção de enzimas proteolíticas e por isso que essas abelhas têm maior capacidade de digestão e consumo de pólen, portanto, nessa fase as glândulas mandibulares e hipofaríngeas produzem substâncias complementares que se misturam formando a geleia real, uma secreção rica em proteínas (CRAILSHEIM et al., 1992; CRAILSHEIM, 1998; HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 1998; HEYLEN et al., 2011; PINTO et al., 2012).

Essas glândulas se localizam na cabeça das abelhas e são estimuladas pela presença de feromônios liberados pela cria e são dependentes da presença de proteínas para o completo desenvolvimento (HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 1998; DESEYN; BILLEN, 2005). As glândulas hipofaríngeas são vestigiais em zangões e rainhas (SNODGRASS, 1956); enquanto as glândulas mandibulares são menores em operárias e zangões, quando comparadas as glândulas de rainhas (LANDIM, 2009).

As glândulas hipofaríngeas produzem a maior parte dos componentes da geleia real e sua secreção é uma substância proteica de aparência clara e aquosa; já a secreção das glândulas mandibulares tem constituição esbranquiçada, tornando-se mais clara e menos abundante após a fase de nutriz (MICHENER, 1974). A geleia real é composta de açúcares, água, proteínas, colesterol, aminoácidos e vitaminas (DESEYN; BILLEN, 2005), e é responsável pela diferenciação de castas, sendo utilizada na nutrição de larvas, abelhas adultas, zangões e da rainha (MICHENER, 1974; CRAILSHEIM, 1998; PINTO et al., 2012).

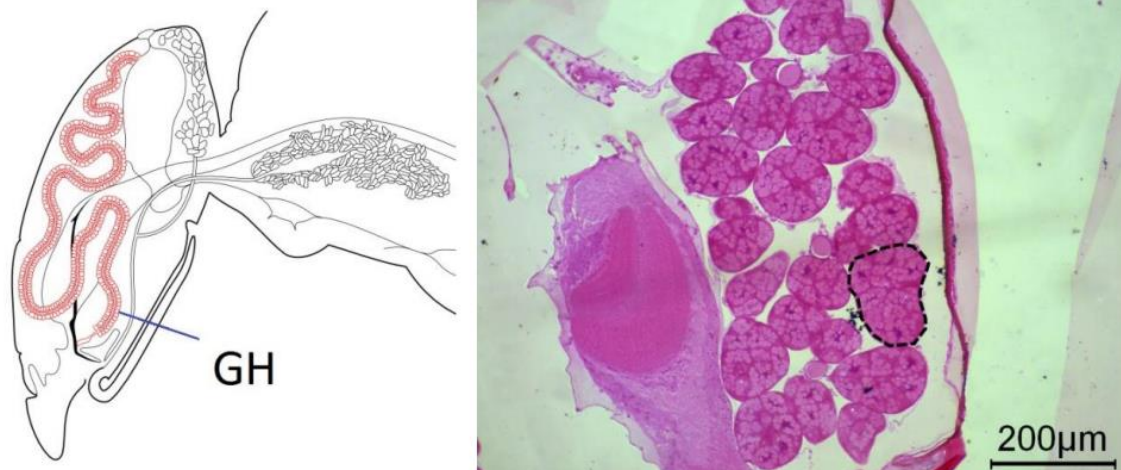
As glândulas mandibulares são estruturas pares, saculares constituídas por um reservatório rodeado por células secretoras formando um pseudoepitélio e suas secreções são canalizadas até a base da mandíbula por um ducto (Figura 1). As secreções provenientes das glândulas mandibulares são ricas em ácido 10-hidrodecenoico (10HDA) utilizado na alimentação de larvas nas primeiras fases de

desenvolvimento. Além disso, essas glândulas também produzem pequenas quantidades de 2-heptanona (2HPT). A secreção da glândula é lançada por meio de um ducto diretamente para a base da mandíbula das abelhas. Sua capacidade de secreção é avaliada pelo tamanho das células secretoras e área de seu reservatório (CRUZ-LANDIM, 2009).



**Figura 1.** Glândula mandibular em *Apis mellifera*. (A) Esquema demonstrando a estrutura sacular da glândula mandibular (MdGld) e sua localização acima da mandíbula (Md) em vista lateral. (B) Células secretoras que formam o pseudoepitélio da glândula mandibular. Fontes: (A) <http://honeybee.drawing.org/book/mandibular-glands-sideview>; (B) Zaluski et al., 2017.

As glândulas hipofaringeanas também são estruturas pares, presentes em todos os himenópteros e são constituídas por centenas de células secretoras. Em *A. mellifera* essas glândulas são formadas por cachos de células secretoras de formato esférico, denominadas ácidos; os cachos podem alcançar 1 cm de comprimento e se enrolam sob o cérebro (Figura 2) (LANDIM, 2009). Cada ácido possui até vinte e duas células secretoras, onde cada célula contém em seu interior um canalículo coletor de secreção e um canalículo extracelular que conduz a secreção para o assoalho bucal, onde esta será descarregada. A adesão entre as células é pequena ou inexistente, portanto, mesmo o ácido sendo pluricelular, a unidade secretora é unicelular, visto que cada célula possui seu próprio canalículo coletor e transportador da secreção, independente das demais. As células secretoras são consideradas grandes com aproximadamente 80  $\mu$ m de diâmetro (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2002, KHEYRI et al., 2013)



**Figura 2.** (Esq.) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (Dir.) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácino. Corados com Hematoxilina e Eosina. Fontes: (Esq.) TOFILSKI (2012); (Dir) SHINOHARA (2018).

Deseyn e Billen (2005) verificaram que abelhas com idade de aproximadamente seis dias (nutrizes) apresentam essa glândula mais desenvolvida, quando comparada a abelhas com diferentes idades (0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 dias). Esses autores demonstraram também que a glândula hipofaringeana é pouco desenvolvida em abelhas recém-emergidas e exibe redução no tamanho dos ácinos em abelhas com mais de 15 dias de idade; que o tamanho da glândula é relacionado com a atividade da mesma e a quantidade de geleia real secretada esta diretamente relacionada ao tamanho dos ácinos, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real.

A redução da atividade de glândulas hipofaringeanas pode prejudicar o crescimento das larvas e afetar a manutenção da colônia (HEYLEN et al., 2011). As abelhas nutrizes consomem até 65 mg de pólen nos primeiros 10 dias de sua vida e por esse motivo são altamente susceptíveis a exposição de produtos como agrotóxicos presentes em pólen contaminado, sendo assim essa é uma forma de ameaça às abelhas (RORTAIS et al., 2005; HALM et al., 2006).

## OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivo geral avaliar os efeitos subletais dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações no desenvolvimento populacional, mortalidade, comportamento higiênico e aspectos morfológicos de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas aos agrotóxicos em condição de campo. Dessa forma, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar o desenvolvimento populacional das colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas;
- Avaliar a mortalidade de abelhas *Apis mellifera* africanizadas;
- Avaliar o comportamento higiênico de abelhas *Apis mellifera* africanizadas;
- Avaliar por meio de análises histológicas, a altura das células secretoras e o volume do reservatório de glândulas mandibulares de abelhas *Apis mellifera* africanizadas nutrizes;
- Avaliar por meio de análises histológicas, o número total e o tamanho dos ácidos das glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas nutrizes;
- E avaliar a morfologia de asas, comprimento e peso de rainhas recém emergidas (princesas) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas ao xarope contaminado pelos herbicidas de forma individual e associada.



## REFERÊNCIAS

- AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2009.
- ALAUX, C. et al. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environ. Microbiol.** v. 12, p. 774-782, 2010.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- AMDAM, G.V.; PAGE, R.E. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Animal behaviour**, v. 79, n. 5, p. 973-980, 2010.
- ARATHI, H.S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae): behavioural repertoire of hygienic bees. **Ethology**, v. 106, n. 4, p. 365-379, 2000.
- ARONZON, C.M. et al. Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. **Environmental toxicology**, v. 26, n. 4, p. 373-381, 2011.
- BALBUENA, M.S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **J. Exp. Biol.**, v. 218, p. 2799-2805, 2015.
- BARTOMEUS, I. et al. Historical changes in northeastern US bee pollinators related to shared ecological traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. 4656-4660, 2013.
- BEEKMAN, M.; RATNIEKS, F.L.W. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. **Functional Ecology**, v. 14, n. 4, p. 490-496, 2000.
- BIESMEIJER, J.C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.
- BIRD, S.L.; ESTERLY, D.M.; PERRY, S. G. **Off-target deposition of pesticides from agricultural aerial spray applications**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1996.
- BOTÍAS, C. et al. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. **Environmental science; technology**, v. 49, n. 21, p. 12731-12740, 2015.
- BRODEUR, J.C. et al. Synergy between glyphosate-and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, v. 112, p. 70-76, 2014.
- 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**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.
- CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Gaia, 2010. 327 p.
- CLUZEAU, S. Risk assessment of plant protection products on honey bees: regulatory aspects. In: **Honey Bees**. CRC Press, 2002. p. 56-69.
- CHRISTOFOLETTI, C.A. et al. O emprego de agrotóxicos na cultura de cana-de-açúcar. **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**, p. 51, 2017.
- COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 14, n. 5-6, p. 469-489, 1994.

- 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. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 47, n. 3, p. 387-395, 2004.
- CONAB, CNDA. Acompanhamento da safra brasileira Cana-de-açúcar. **Ministério da Agricultura**, 2014.
- CONNOLLY, C. The risk of insecticides to pollinating insects. **Communicative; integrative biology**, v. 6, n. 5, p. 1634, 2013.
- CORREIA, F.V.; MOREIRA, J.C. Effects of glyphosate and 2, 4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 85, n. 3, p. 264-268, 2010.
- COX, C. Glyphosate factsheet: part 2 of 2. **J. Pestic. Reform**, v. 108, n. 3, p. 1-16, 2000.
- COX, C.; SURGAN, M.. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803-1806, 2006.
- CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. **Journal of comparative physiology B**, v. 162, n. 8, p. 681-689, 1992.
- CRAILSHEIM, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 29, n. 1-2, p. 97-112, 1998.
- CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. Routledge, 1999.
- CREMER, S.; ARMITAGE, S.AO; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. **Current biology**, v. 17, n. 16, p. R693-R702, 2007.
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C. (Ed.). **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002.
- CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas: Morfologia e funções de sistemas**. Unesp, 2009.
- DAI, P. et al. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7786-7793, 2018.
- DAMALAS, C.A. Pesticide drift: seeking reliable environmental indicators of exposure assessment. In: ARMON, R. H.; HÄNNINEN, O. (Ed.). **Environmental indicators**. Netherlands: Springer, 2015. p. 251-261
- DANFORTH, B. Bees - a primer. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 5, p. R156-R161, 2007.
- DE ARCAUTE, C.R. et al. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological indicators**, v. 45, p. 632-639, 2014.
- DE ARCAUTE, C.R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. Synergism of mixtures of dicamba and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide formulations on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Pollution**, v. 236, p. 33-39, 2018.
- DE CASTRO MARCATO, A.C.; DE SOUZA, C.P.; FONTANETTI, C.S. Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 3, p. 120, 2017.
- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 49-57, 2005.
- DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M.H. **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002.

- DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J; PHAMDELÉGUE, M-H. (Orgs.). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor & Francis, 2002. p. 56-66.
- DOSSELAERE, F.; VANDERLEYDEN, J. A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. **Critical reviews in microbiology**, v. 27, n. 2, p. 75-131, 2001.
- EJOMAH, A.J.; UYI, O.O.; EKAYE, S.O. Exposure of the African mound building termite, *Macrotermes bellicosus* workers to commercially formulated 2, 4-D and atrazine caused high mortality and impaired locomotor response. **PloS one**, v. 15, n. 3, p. e0230664, 2020.
- ELLENHORN, M.J.; BARCELOUX, D. G. Diagnosis and treatment of human poisoning. **Medical toxicology**, p. 609-610, 1997.
- ELLIS, J. The honey bee crisis. *Outlooks Pest Manag.*, v. 23, p. 35-40, 2012.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.
- FREITAS, J.S. et al. Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 182, p. 109446, 2019.
- FREYDIER, L.; LUNDGREN, J.G. Unintended effects of the herbicides 2, 4-D and dicamba on lady beetles. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 1270-1277, 2016.
- FUNKE, T. et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13010-13015, 2006.
- GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 419-430, 2004.
- GARIBALDI, L.A. et al. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 12, n. 8, p. 439-447, 2014.
- GERDTS, J. et al. Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0203969, 2018.
- 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.
- GIROLAMI, V. et al. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 5, p. 1808-1815, 2009.
- GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.
- GREGORC, A.; ELLIS, J.D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 99, n. 2, p. 200-207, 2011.
- GREGORC, A. et al. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 8, p. 1042-1049, 2012.
- GUPTA, R.K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: GUPTA, R. K. et al. (Ed.). *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Netherlands: Springer, 2014. p. 63-103.
- HALD, A.B. Weed vegetation (wild flora) of long established organic versus conventional cereal fields in Denmark. **Annals of Applied Biology**, v. 134, n. 3, p. 307-314, 1999.

- HALM, M.P. et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.*, v. 40, n. 7, p. 2448-2454, 2006.
- HANLEY, N. et al. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. **Ecosystem services**, v. 14, p. 124-132, 2015.
- HARPUR, B.A. et al. No genetic tradeoffs between hygienic behaviour and individual innate immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104214, 2014.
- HERBERT, L.T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **Journal of experimental biology**, v. 217, n. 19, p. 3457-3464, 2014.
- HEYLEN, K. et al. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 103-116, 2011.
- HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.*, v. 44, n. 10, p. 929-939, 1998.
- HU, S. et al. Early steps of angiosperm pollinator coevolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 1, p. 240-245, 2008.
- HYVÖNEN, T.; SALONEN, J. Weed species diversity and community composition in cropping practices at two intensity levels—a six-year experiment. **Plant ecology**, v. 159, n. 1, p. 73-81, 2002.
- IARC WORKING GROUP et al. International Agency for Research on Cancer Volume 112: some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC (Int. Agency Res. Cancer) Monogr. **IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum**, 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2019.
- ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332-351, 2018.
- IPPOLITO, A. et al. Modeling global distribution of agricultural insecticides in surface waters. **Environmental Pollution**, v. 198, p. 54-60, 2015.
- 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.
- KHEYRI, H.; CRIBB, B.W.; MERRITT, D.J. Comparing the secretory pathway in honeybee venom and hypopharyngeal glands. **Arthropod structure & development**, v. 42, n. 2, p. 107-114, 2013.
- KLEIN, A.M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.
- KREMEN, C. et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology letters**, v. 10, n. 4, p. 299-314, 2007.
- 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.
- LANDIM, C.C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 408 p.
- LEBLANC, G.A.; WANG, G. Chemical mixtures: greater-than-additive effects? **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 9, p. A517-A518, 2006.
- LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 27, n. 2, p. 499-510, 2008.

- LONG, E. Y.; KRUPKE, C.H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016.
- MARTÍNEZ, I.M.; LUMARET, J.P.; CRUZ, M.R. Suspected side effects of a herbicide on dung beetle populations (Coleoptera: Scarabaeidae). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 324, n. 11, p. 989-994, 2001.
- MICHENER C. D. The Social Behavior of the Bees. Harvard University Press, 1974.
- MICHENER, C.D. The bees of the world. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2 ed. 2007.
- 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.
- MORTON, H.L.; MOFFETT, J.O.; MACDONALD, R.H. Toxicity of herbicides to newly emerged honey bees. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 1, p. 102-104, 1972.
- MOTTA, E.VS; RAYMANN, K.; MORAN, N.A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305-10310, 2018.
- MULLIN, C.A. et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS one**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.
- MURSCHELL, T.; FARMER, D.K. Real-time measurement of herbicides in the atmosphere: A case study of MCPA and 2, 4-D during field application. **Toxics**, v. 7, n. 3, p. 40, 2019.
- 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](http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/030302000000_13032015.pdf)>.
- PAGE, R.E.; PENG, C.Y.S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.
- PALACIO, M.A. et al. Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. **Apidologie**, v. 41, n. 6, p. 602-612, 2010.
- PAUDEL, Y.P. et al. Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: Current status, impacts, and potential drivers of decline. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 6, p. 93, 2015.
- PARK, K. et al. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 439-446, 2010.
- PARKER, R. et al. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11096, 2010.
- PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and environmental Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17-29, 1995.
- PINTO, F.A. et al. Nutritional and temporal effects on hypopharyngeal glands of africanized honeybees (Hymenoptera – Apidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 2, p. 447-456, 2012.
- PISA, L.W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.
- POTTS, S.G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology; evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- RAMOS, H.H.; DURIGAN, J.C. Avaliação da eficiência da mistura pronta de glyphosate+ 2, 4-D no controle da *Commelina virginica* L. em citros. **Planta Daninha**, v. 14, p. 33-41, 1996.

- RAVOET, J. et al. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72443, 2013.
- RECH, A.R.; AVILA-JUNIOR, R.S.; SCHLINDWEIN, C. Síndromes de polinização: especialização e generalização. In: Rech, A.R. et al., *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 527 p.
- RENZI, M.T. **Effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.): study of a specific route of exposure and evaluation of biochemical-physiological changes in the assessment of the pesticides toxicity**. 2013. Tese de Doutorado. Université d'Avignon; Università degli studi (Bologne, Italie).
- 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, n. 1, p. 71-83, 2005.
- ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. **Animal behaviour**, v. 12, n. 4, p. 578-583, 1964.
- 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.
- 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
- SEELEY, T.D. *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. London: Harvard University Press, 1995. 295 p.
- SHINOHARA, A.J. Efeito da suplementação de fonte inorgânica de ferro no desenvolvimento da glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* L. 2018.
- SILVA, L.C.M et al. Acute and chronic toxicity of 2, 4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 9, p. 1462-1475, 2020.
- SINGH, Vandana; SINGH, Keshav. Toxic effect of herbicide 2, 4-D on the earthworm *Eutyphoeus waltoni* Michaelsen. **Environmental Processes**, v. 2, n. 1, p. 251-260, 2015.
- SNODGRASS, R. E. *Anatomy of the honeybee*. Ithaca: Cornell University Press, 1956. 315 p.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M.. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. **Bee world**, v. 79, n. 4, p. 169-186, 1998.
- SPIVAK, M.. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. **Apidologie**, v. 27, n. 4, p. 245-260, 1996.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M.. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. **Journal of Apicultural Research**, v. 32, n. 3-4, p. 147-157, 1993.
- SPRINGETT, J.A.; GRAY, R.A.J. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporectodea caliginosa* in laboratory culture. **Soil Biol. Biochem.**, v. 24, p. 1739-1744, 1992.
- STORT, A.C.; GONÇALVES, L.S.A africanização das abelhas "*Apis mellifera*" nas Américas – I. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 33-47.
- SINGH, V.; SINGH, K.. Toxic effect of herbicide 2, 4-D on the earthworm *Eutyphoeus waltoni* Michaelsen. **Environmental Processes**, v. 2, n. 1, p. 251-260, 2015.
- 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.

- TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie*, v. 39, n. 5, p. 558-563, 2008.
- TOME, H.V.V. et al. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environmental Pollution*, v. 256, p. 113420, 2020.
- 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 VEEN, J.W. Biology of honeybees and stingless bees. In: GUPTA, R. K. et al. (Ed.). *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Netherlands: Springer, 2014. p. 105-123.
- VARONA-URIBE, Marcela Eugenia et al. Exposure to pesticide mixtures and DNA damage among rice field workers. *Archives of environmental & occupational health*, v. 71, n. 1, p. 3-9, 2016.
- VÁZQUEZ, D.E. et al. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PloS one*, v. 13, n. 10, p. e0205074, 2018.
- VÁZQUEZ, D.E. et al. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environmental Pollution*, v. 261, p. 114148, 2020.
- WIESE, H. *Apicultura Novos Tempos*. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2005. 378p.
- WILSON, E.O. *The Insect Societies*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press. 1971.
- WILSON-RICH, N. et al. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology*, v. 54, p. 405-423, 2009.
- WINSTON, M.L. *A biologia da abelha*. Tradução: OSOWSKI, C. A. Porto Alegre: Magistre, 2003. 276 p.
- 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.; JUSTULIN, L.A.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- ZHANG, W.J.; JIANG, F.B.; OU, J.F. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences*, v. 1, n. 2, p. 125, 2011.
- ZHAO, H. et al. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Science of The Total Environment*, v. 744, p. 140819, 2020.

# CAPÍTULO 2



## **Efeito de doses subletais dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações no comportamento higiênico, desenvolvimento populacional, mortalidade e aspectos morfológicos de abelhas *Apis mellifera***

### **RESUMO**

Apesar da sua importância como polinizadores, as populações de abelhas *Apis mellifera* L vêm sofrendo redução em diversas regiões do planeta, prejudicando a sobrevivência da espécie e a manutenção dos ecossistemas. O uso de herbicidas em cultivos agrícolas tem sido apontado como um dos fatores responsáveis, inclusive em doses subletais, que além de causar mortalidade, podem levar a alterações comportamentais e fisiológicas nas abelhas, como a capacidade de secreção das glândulas mandibulares e hipofaríngeas de abelhas nutrízes, responsáveis pela produção de geleia real, alimento das crias e rainha. As rainhas são as responsáveis pela postura dos ovos que darão origem às demais abelhas da colmeia, alterações na sua capacidade de realizar o voo nupcial ou na postura de ovos podem comprometer o desenvolvimento e a sobrevivência da colmeia. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos de doses subletais dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas na fase de nutrízes, bem como no desenvolvimento populacional, mortalidade e comportamento higiênico de colônias de abelhas, além da morfometria de rainhas recém emergidas de abelhas *Apis mellifera* L.. Para isso, colônias de abelhas *Apis mellifera* alojadas em núcleos padrão americano, receberam ou não, por dias consecutivos xarope (água e açúcar na proporção de 1:1) contaminado com as doses subletais de glifosato (5,47 µg/abelha), 2,4-D (2,55 µg/abelha) e suas associações. Para as análises das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, abelhas previamente marcadas e com seis dias de vida, foram coletadas de suas colmeias ao final do fornecimento dos tratamentos. Para a coleta de rainhas para análise de comprimento total corporal, peso, comprimento e largura de asas foi feita a orfanização das colônias para criação de realeiras. Embora não tenham sido identificadas alterações no comportamento higiênico, mortalidade e desenvolvimento populacional, foi observado efeito na área e altura das glândulas mandibulares, para os tratamentos, em relação ao controle. Por outro lado, não houve alteração no número de ácidos das glândulas hipofaríngeas, embora observa-se redução das áreas dos ácidos em todos os tratamentos, em relação ao controle. Também não foram identificadas alterações

morfométricas, mas foi observado efeito na taxa de rainhas que emergiram das realeiras, sendo a taxa de associação dos herbicidas a mais comprometida. Dessa forma, pode-se concluir que doses subletais de glifosato, 2,4-D e suas associações são capazes de promover alterações no desenvolvimento glandular de abelhas na fase de nutrízes e na capacidade de criação de novas rainhas de abelhas *Apis mellifera*.

**Palavras-chave:** abelhas, herbicidas, glifosato, 2,4-D.

**Effect of sublethal doses of glyphosate and 2,4-D herbicides on hygienic behavior, population development, mortality and morphological aspects of *Apis mellifera* bees**

**ABSTRACT**

Despite their importance as pollinators, populations of *Apis mellifera* L honey bees have been reduced in several regions of the planet, compromising the survival of the species and the maintenance of ecosystems. The use of herbicides in crops has been identified as one of the responsible factors, even sublethal doses, which can not only cause mortality but also lead to behavioral and physiological changes in bees, such as the capacity of secretion of the mandibular and hypopharyngeal glands of nurse bees. Nurse bees are responsible for the production of royal jelly, the food for the offspring and queen. The queens are responsible for laying the eggs that will become bees in the hive, changes in their ability to perform the nuptial flight or egg laying can compromise the development and survival of the hive. Thus, the objectives of the present study were to evaluate the effects of sublethal doses of the herbicides glyphosate, 2,4-D and their combination on the mandibular and hypopharyngeal glands of nurse bees, as well as on population development, mortality and hygienic behavior of bees, besides the morphometry of newly emerged *Apis mellifera* L. queens. For this, *Apis mellifera* colonies were housed in standard nuclei, and the number of frames with combs of brood and food were standardized. The colonies received, for consecutive days, syrup (water and sugar in the proportion of 1:1 ) contaminated or not with sublethal doses of glyphosate (5.47 µg/bee), 2,4-D (2.55 µg/bee) and their combinations. For the hypopharyngeal and mandibular glands analysis, six days old bees previously marked were collected from their hives at the end of the treatments. The population development, hygienic behavior and mortality of adult bees were also evaluated. For the collection of queens for analysis of total body length, weight, length and width of wings, colonies were orphaned to create queens. Although no changes were identified in hygienic behavior, mortality and population development, an effect was observed in the area and height of the mandibular glands, for the treatments when compared to the control. There was no change in the number of acini of the hypopharyngeal glands, although a reduction in the acini areas was

observed in all treatments when compared to the control. Morphometric changes were not identified, but an effect was observed on the rate of queens that emerged, with the combination of the herbicides rate being the most compromised. Thus, it can be concluded that sublethal doses of glyphosate, 2,4-D and their associations are capable of promoting changes in the glandular development of bees in the nurse phase and in the ability to create new *Apis mellifera* queens.

**Keywords:** honey bees, herbicides, glyphosate, 2,4-D.

## INTRODUÇÃO

A polinização é essencial para a manutenção do ecossistema e para a agricultura, pois cerca de 35% das culturas alimentares no mundo dependem de polinizadores, sendo as abelhas, *Apis mellifera* L. um dos principais (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010). Apesar dessa importância, as populações de abelhas vêm sofrendo redução mundialmente (KLEIN et al., 2007; JOHNSON et al., 2010; VANENGELSDORP; MEIXNER, 2010; GOULSON et al., 2015).

Os principais fatores responsáveis, que podem atuar sozinhos ou sinergicamente para prejudicar a manutenção dos polinizadores são: redução e fragmentação de habitat dos polinizadores, disponibilidade de recursos, espécies invasoras, disseminação de doenças e parasitas, no entanto, o uso de diferentes agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas, tem sido apontado como uma das causas principais (POTTS et al., 2010; GOULSON et al., 2015; JOHNSON, 2015; KAIRO et al., 2016).

Existem dois herbicidas que são utilizados em larga escala na maioria dos países: o glifosato e o 2,4-D. (ZHANG et al., 2011). O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) em plantas e alguns microrganismos impedindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais e outros metabólitos secundários necessários para o crescimento (SHILO et al., 2016; MOTTA et al., 2018). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida que imita a ação do hormônio de crescimento vegetal auxina, estimulando o crescimento descontrolado e morte em plantas suscetíveis (SONG, 2014). O 2,4-D foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (SUZUKI, 2017) e é o segundo agrotóxico mais vendido no Brasil em 2017 depois do glifosato (ZUANAZZI et al., 2019)

A aplicação frequente de um herbicida pode levar ao desenvolvimento de algumas espécies de plantas daninhas resistentes e por isso, em muitas culturas é feita a aplicação associada dos herbicidas, como se faz com o 2,4-D e o glifosato, a fim de aumentar o controle dessas plantas indesejadas (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.

As abelhas operárias na fase de nutrizes estão suscetíveis a esse tipo de contaminação, pois são abelhas que consomem significativa quantidade de pólen, que é um recurso com alta chance de estar contaminado (RORTAIS et al., 2005; HALM et al., 2016). Essa fase de grande especialização das abelhas se caracteriza pelo desenvolvimento das glândulas mandibulares e hipofaríngeas, responsáveis pela produção de geleia real (HRASSNIG; CRAILSHEIM, 1998; DESEYN et al., 2005;). Essas glândulas são localizadas na cabeça das abelhas, têm pico de desenvolvimento por volta dos 6 dias de idade e são estimuladas pela presença de feromônios liberados pela cria (LANDIM, 2009; PETERS; ZHU-SALZMAN; PANKIW, 2010).

Estudos realizados com inseticidas e fungicidas demonstraram que doses subletais dos produtos podem afetar o desenvolvimento, como a redução no diâmetro dos ácinos das glândulas hipofaríngeas. Sendo assim, a exposição de abelhas a agrotóxicos pode levar a alterações nessas glândulas, reduzindo a capacidade de secreção de geleia real pelas abelhas nutrizes e conseqüentemente prejudicando toda colônia e até mesmo o desenvolvimento populacional e mortalidade das abelhas (SMODIŠ ŠKER; GREGORC, 2010; HEYLEN et al., 2011; HATJINA et al., 2013).

Outro aspecto que pode ser comprometido é o comportamento higiênico das abelhas, o qual é a habilidade da operária de detectar, desopercular e remover a cria doente e morta das células para minimizar infestações (PENG et al., 1987; SPIVAK; REUTER, 2001). Importante para a imunidade social em colônias de abelhas, esse mecanismo de defesa bem-sucedido contra doenças das abelhas como, cria pútrida americana, cria giz e o ácaro *Varroa*. Mudanças no comportamento higiênico podem afetar o controle de doenças, causando efeitos na mortalidade de indivíduos e até no desenvolvimento populacional da colônia (RINDERER et al., 2001; SPIVAK; REUTER, 2001; SPIVAK; DANKA, 2021).

Esses produtos também podem causar anormalidades morfológicas, como malformação ou redução das asas, afetando assim a capacidade de voo das abelhas (ATKINS; KALLUM; 1986). A exposição subletal persistente também pode reduzir a probabilidade de uma colônia criar com sucesso uma rainha, como por exemplo, em um estudo no qual menos da metade das colmeias alimentadas com pólen contaminado por agrotóxicos foram capazes de criar novas rainhas, o que pode levar a colmeia ao declínio (DEGRANDI-HOFFMAN et al, 2013).

Características morfométricas corporais podem ser indicadores indiretos de produtividade da colmeia e também podem ser utilizados como forma de seleção de produtividade, na qual, abelhas com pernas e asas maiores têm maior sucesso ao coletar mais pólen e néctar. Essas características morfológicas estão relacionadas à produtividade da colmeia (MOSTAJERAN et al. 2006; ABOU-SHAARA et al, 2013). Condições estressantes ou toxinas podem levar a mudanças na forma, tamanho ou assimetria das asas em insetos, essas alterações morfométricas podem afetar o comportamento das abelhas, como o tempo das viagens de forrageamento, comprometendo também a polinização (DINGHA et al., 2004; GÉRARD et al., 2018; GÉRARD et al., 2022). Para as rainhas, esse tipo de alteração pode afetar a capacidade de realizar o voo nupcial ou de enxamear.

O tamanho do corpo e peso da rainha também podem ser usados como características que indicam produtividade, uma vez que rainhas mais pesadas têm mais ovários, espermatecas maiores e mais espermatozoides nas espermatecas (WOYKE, 1971; KAFTANOGLU et al., 2000; AKYOL et al, 2008). Dessa forma, há uma importância em se medir mudanças morfológicas em resposta a fatores ambientais, pois condições estressantes podem levar ao aumento da variação fenotípica (HOFFMANN et al., 2002; PINTO et al., 2015; LACK et al., 2016; DELLICOUR et al., 2017; GÉRARD et al., 2022).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos subletais dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações no desenvolvimento populacional, na mortalidade e no comportamento higiênico, de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. Considerando as informações sobre a morfologia de abelhas, também foi objetivo avaliar o efeito destes herbicidas no desenvolvimento de glândulas mandibulares e hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase nutrízes e na morfometria de rainhas recém emergidas de abelhas *Apis mellifera*, analisando comprimento total corporal, peso, além de comprimento e largura de asas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.1. Local do Experimento**

O projeto foi desenvolvido no Apiário do Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizado na Fazenda Experimental Lageado da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: 22°50'28" de latitude Sul e 48°25'42" de longitude Oeste, com clima tipo Cfa e altitude média de 623 metros pela classificação de Köppen (DA CUNHA; MARTINS, 2009).

## 1.2. Tratamentos

Os experimentos foram realizados em duas etapas, na primeira, durante os meses de agosto e setembro de 2020, foram avaliados comportamento higiênico, mortalidade, desenvolvimento populacional e as glândulas de abelhas nutrizas para isso foram utilizadas 16 colmeias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas alojadas em núcleos padrão Langstroth. Já na segunda fase, realizada em maio de 2022, houve a indução de realeiras para produção e análise morfométrica de rainhas e foram utilizadas 12 colmeias. Todas as colônias estavam livres de doenças e parasitas, avaliados visualmente. Protocolo Comitê de Ética n°0048/2020-CEUA.

As colmeias foram padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento (três quadros de cria e dois quadros de alimento) e distribuídas em quatro tratamentos, sendo 4 colmeias para cada: o controle, no qual as colônias receberam xarope de açúcar (água + açúcar na proporção 1:1) sem adição de herbicida; as tratadas com xarope de açúcar contaminado com dose subletal ( $DL_{50/50}$ ) do herbicida glifosato (Roundup® Transorb R, Monsanto do Brasil Ltda.); as tratadas com xarope de açúcar contaminado com dose subletal ( $DL_{50/50}$ ) do herbicida 2,4-D (Exemplo®, Albaugh Agro Brasil Ltda.); e as tratadas com associação dos dois herbicidas ( $DL_{50/50}$  do glifosato e do 2,4-D).

As doses letais ( $DL_{50}$ ) foram determinadas em trabalho anterior (LUNARDI, 2018), sendo: 273,93 µg/abelha para o glifosato e 127,70 µg/abelha para o 2,4-D, ambos por ingestão. A dose subletal de cada herbicida fornecida às colônias foi de 1/50 da  $DL_{50}$  (dose letal média capaz de exterminar 50% de uma população), portanto, as doses subletais foram: 5,47 µg/abelha para o glifosato, 2,55 µg/abelha para o 2,4-D, além da associação dos dois herbicidas.



As colônias receberam xarope de açúcar contaminado ou não contaminado com os herbicidas em dose subletal (ingrediente ativo do herbicida utilizado a partir da formulação comercial utilizada em campo), na quantia de 500 mL de xarope, por meio de alimentador tipo Boardman, durante seis dias. As composições dos ingredientes inertes não foram divulgadas nos rótulos dos produtos utilizados neste estudo. Os herbicidas foram diluídos em água destilada. Diariamente o xarope de açúcar foi renovado e quantidade consumida foi mensurada, como forma de garantir que as abelhas consumiram o tratamento desde o primeiro dia até a fase de operária nutriz, quando ocorre o pico de desenvolvimento das glândulas produtoras de geleia real (KNECHT; KAATZ, 1990; DESEYN; BILLEN, 2005; LANDIM, 2009; RAHMAN et al., 2014).

### **1.3. Morfologia de glândulas**

Antes do início dos experimentos, de cada colmeia, alojada em um núcleo, foi retirado um quadro de cria fechada que foi envolvido em tecido filó. As abelhas que emergiram tiveram o pronoto marcado com caneta marcadora não tóxica (Posca Paint Pens, Mitsubishi Pencil, Japan) com a cor específica do tratamento a qual pertenciam. Após marcadas as abelhas foram devolvidas ao núcleo e o tratamento com xarope iniciado. Após 6 dias de exposição ao xarope contaminado e puro, 10 abelhas operárias nutrizas marcadas foram coletadas por núcleo. Posteriormente, as abelhas foram anestesiadas em freezer e decapitadas (ZALUSKI et al., 2017).

Os procedimentos a seguir foram baseados e adaptados de Smodiš-Škerl e Gregorc (2010). As cabeças inteiras foram fixadas (4% paraformaldehyde/1 × PBS) por 24 horas, lavadas com água destilada e transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio (5%) e hidróxido de sódio (7,5%) por 5 horas à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Em seguida, passaram por uma série de banhos de 2 horas em cada concentração de etanol (70, 80, 90 e 95%) para desidratação. Foi realizado corte nas porções anterior e posterior das cabeças (eliminando cerca de 1 mm de quitina) sob um estereomicroscópio, as cabeças foram então incorporadas em resina (Leica Historesin Embedding Kit; Leica, Nussloch, Alemanha) e incluídas em moldes de polietileno (2 cabeças/bloco) para a confecção dos blocos histológicos. Os blocos foram processados em cortes semi-seriados, na espessura de 3  $\mu$ m pelo micrótomo rotativo automático (Leica RM2155; Alemanha) (ZALUSKI et al., 2017). Para cada

bloco foram produzidos em média 12 lâminas contendo 12 cortes cada. Para cada grupo experimental foram utilizados 5 blocos, sendo que cada bloco era constituído de 2 cabeças, totalizando 20 blocos (5 para cada tratamento).

Cortes histológicos foram realizados a cada 30  $\mu\text{m}$  para evitar medir ácinos da mesma glândula hipofaringeana mais de uma vez e para garantir a avaliação das glândulas mandibulares ao longo de sua extensão. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados sob microscópio Leica DMLB 80 conectado a uma câmera Leica DC300FX. As imagens digitalizadas foram analisadas morfometricamente através do software Leica Q-win versão 3.1 para Windows<sup>TM</sup> (Leica, Heidelberg, Alemanha) (ZALUSKI et al., 2017).

Para a determinação da área do reservatório das glândulas mandibulares, 10 abelhas (5 blocos) foram analisados por tratamento, sendo 200 imagens analisadas por tratamento (20 imagens por abelha, 40 imagens por bloco). Também foi realizada a medida da altura da células das glândulas mandibulares, 10 células para cada seção da glândula ( $n = 20$ ) por abelha ( $n = 10$ ) para um total de 2000 medições celulares selecionadas aleatoriamente. As análises foram realizadas na altura média das células por glândula medida.

Em relação as glândulas hipofaringeanas, 10 abelhas (5 blocos) foram analisados por tratamento, sendo 200 imagens analisadas por tratamento (20 imagens por abelha, 40 imagens por bloco) para evitar que o mesmo ácino fosse mensurado mais de uma vez. Para a determinação do número de ácinos foi realizada a contagem de todos os ácinos de cada corte histológico ( $n=10$  abelhas/grupo); totalizando 200 medidas para cada grupo experimental. Para a determinação da área dos ácinos, todos os ácinos de cada corte histológico foram contornados e a área média ( $\text{mm}^2$ ) determinada, porém, considerando a variação da área dos ácinos da glândula hipofaringeana foram comparados 100 maiores ácinos de cada animal.

#### **1.4. Desenvolvimento populacional**

Para a avaliação do desenvolvimento populacional foi utilizada a metodologia adaptada de Al-Tikrity et al. (1971), na qual foram selecionados e identificados dois quadros com postura em cada núcleo para serem analisados do início ao fim do experimento. Semanalmente, por 60 dias os quadros selecionados de cada

tratamento foram retirados do núcleo, colocados em suporte com laterais de madeira, formando quadrados de 2x2 cm e tiveram suas áreas de cria aberta, fechada (operculada) e alimento estocado, fotografados e avaliados para análise de um possível efeito do tratamento sobre o desenvolvimento populacional do enxame.

### **1.5. Mortalidade**

Antes do início do experimento, foram instalados coletores de abelhas mortas do tipo “underbasket” embaixo do alvado de cada núcleo e a mortalidade foi contabilizada diariamente (ACCORTI et al., 1991) durante o período de 60 dias.

### **1.6. Comportamento higiênico**

O comportamento higiênico das colônias foi avaliado por meio do método de perfuração de células de cria operculadas, conforme metodologia descrita por Garcia et al. (2013). A avaliação foi realizada antes e a cada 14 dias após o início dos tratamentos, durante 60 dias.

Para isso, cada colônia teve um quadro de cria retirado e duas áreas vizinhas (area A and B) contendo aproximadamente 100 células operculadas (CO) foram selecionadas e marcadas. Uma das áreas de cria selecionada (área A) com 100 células operculadas foi perfurada com auxílio de alfinete entomológico, a outra área (área B) as 100 células foram mantidas íntegras e o quadro foi devolvido à colmeia para que as operárias realizassem a remoção das crias mortas e reavaliado após 24 h. Para análise, contou-se o número total de crias operculadas submetidas à perfuração (área A), e subtraiu-se o número total de alvéolos vazios do número de alvéolos perfurados, obtendo-se o número de pupas retiradas por trabalhadores higiênicos.

Na área B, foi calculado o fator de correção Z, a taxa natural de pupas removidas em uma área correspondente, a qual é subtraída do valor de pupas removidas na área A. O resultado foi considerado se o valor do fator de correção (área B) fosse igual ou inferior a 10%. O valor de Z foi calculado pela fórmula:  $Z = (Y \times 100) / A$ , onde A = número de pupas na área A e Y = número de células vazias onde as pupas foram removidas naturalmente. O valor de Y é obtido por  $Y = C - B$ ; onde C = número de células vazias do controle após o quadro ter sido submetido a um teste de comportamento higiênico e B = o número de células vazias no controle, antes que o

quadro tenha sido submetido a um teste de comportamento higiênico. A taxa de comportamento higiênico (HBR - hygienic behavior rate) de cada colônia foi calculada pela fórmula  $HBR = (CV1 - CV \times 100 - Z) / CO$ ; onde CV1 = número de células vazias 24 h após a perfuração, CV = número de células vazias antes da perfuração, CO = número de células operculadas antes da perfuração e Z = fator de correção obtido na área de controle.

### **1.7. Morfometria de rainhas recém emergidas**

Durante o mês de maio de 2022, foram utilizadas 12 colmeias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas alojadas em núcleos padrão Langstroth, com número de quadros de cria e alimento padronizados (três quadros de cria e dois quadros de alimento) e distribuídas nos mesmos quatro tratamentos, sendo três colônias para cada. As colônias receberam por 13 dias o xarope de açúcar contaminado ou não com os herbicidas em dose subletal (ingrediente ativo do herbicida utilizado a partir da formulação comercial utilizada em campo), na quantia de 500 mL de xarope, por meio de alimentador tipo Boardman. O xarope de açúcar foi renovado diariamente e a quantidade consumida foi mensurada, para garantir o consumo (KNECHT; KAATZ, 1990; DESEYN; BILLEN, 2005; LANDIM, 2009; RAHMAN et al., 2014).

No dia anterior ao início do fornecimento do xarope, 24h antes, as colônias foram orfanizadas, ou seja, as rainhas foram identificadas e mortas para que se induzisse a criação de realeiras, das quais seriam coletadas as rainhas para análise. Então o fornecimento de xarope foi iniciado ao longo do período de 13 dias sendo esse o período de criação de novas rainhas nas colmeias, ou seja, durante os 3 dias de ovo, os aproximadamente 5 dias de larva e os aproximadamente 7 dias de pré pupa e pupa. No 14º dia as realeiras foram coletadas para que as rainhas não emergissem na colmeia, separadas individualmente em gaiolas identificadas e colocadas em incubadora a uma temperatura de aproximadamente 30º C e umidade relativa de 70% para que fossem analisadas ao emergirem.

Assim que emergiam, as rainhas foram anestesiadas em freezer a -18º C, por um período de 1 a 2 minutos (ZALUSKI et al., 2015), a fim de possibilitar o manejo durante a mensuração de parâmetros biométricos: peso, comprimento corporal, altura e largura de asas. Em seguida, as abelhas foram pesadas utilizando-se uma balança

de precisão e fotografadas sobre uma régua milimétrica para avaliação do comprimento total. Para tanto, foi considerada a medida do início da cabeça até o final do abdômen de cada abelha, as imagens foram mensuradas com o software Image J® e foram realizadas medições em triplicada por indivíduo.

Para a medição das asas (comprimento e largura), de cada abelha foram retiradas as asas anteriores direitas (Figura 1), com o auxílio de pinças entomológicas, seguido de montagem de lâmina (BRETTELL et al, 2017). As lâminas de cada tratamento foram fotografadas com o auxílio estereomicroscópio Leica DMI 4000 B e das imagens foram realizadas três mensurações de cada estrutura por meio do programa Image J®.



**Figura 3.** Asa anterior direita de abelha rainha *Apis mellifera* sinalizando a forma de medição do comprimento e largura. Fonte: material elaborado pelo autor.

### 1.8. Análise Estatística

Os valores obtidos são apresentados como média e desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana e intervalos interquartis (para distribuição não normal). Os dados obtidos de cada variável foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. Quando esses requisitos foram atendidos, as comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. Quando um dos requisitos não foi atendido, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado com o teste de Dunn. Foi considerada como diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

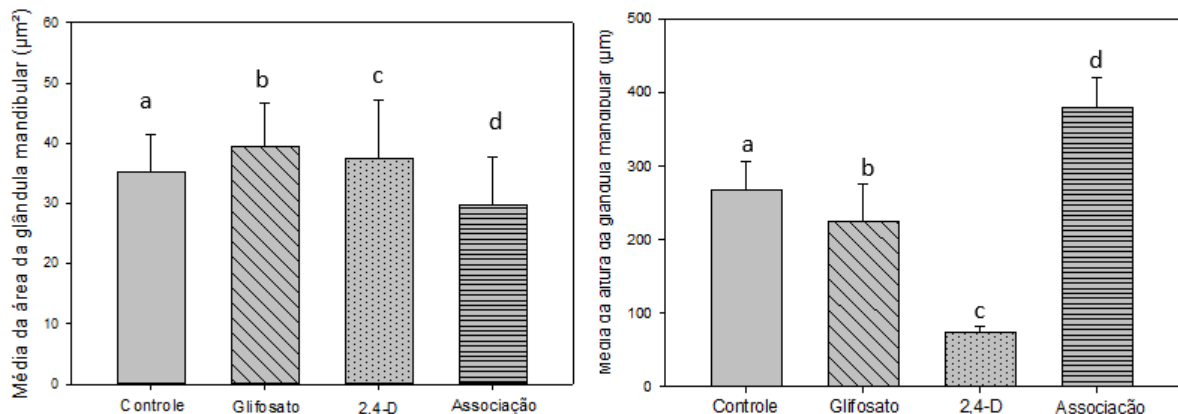
## RESULTADOS

A partir dos resultados da área do reservatório da glândula mandibular (Gráfico 1) foi observado que a administração dos herbicidas glifosato e 2,4-D de forma isolada promoveu aumento na área da glândula mandibular em comparação ao grupo

controle, contudo, a exposição combinada dos dois herbicidas promoveu redução significativa da área da glândula mandibular em comparação aos tratamentos.

Em relação à altura da glândula mandibular (Gráfico 1), a administração de ambos os herbicidas de forma isolada ou em associação promoveu alterações na glândula. De forma isolada, tanto o glifosato como o 2,4-D diminuíram a altura da glândula mandibular, sendo essa alteração mais pronunciada nos animais expostos ao 2,4-D. Quanto à exposição combinada aos dois herbicidas, foi observado efeito oposto ocorrendo aumento da altura da glândula mandibular.

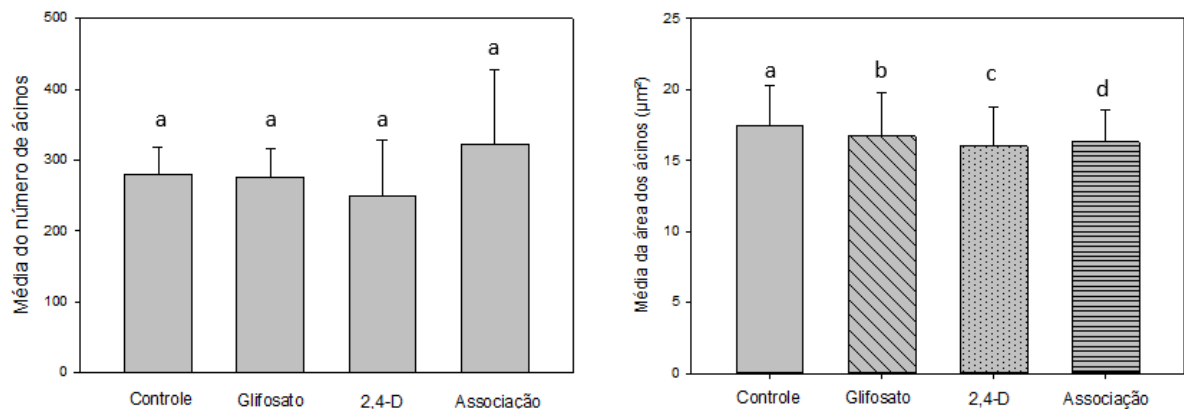
**Gráfico 1.** Média da área ( $\mu\text{m}^2$ ) e da altura ( $\mu\text{m}$ ) de glândulas mandibulares de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação em comparação ao controle. Os valores expressam as medianas seguidas dos intervalos interquartis (Q1-Q3).



Os valores expressam as medianas seguidas dos intervalos interquartis (Q1-Q3). Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Quanto à análise da glândula hipofaríngea (Gráfico 2), apesar de não ter sido observada alteração no número de ácidos entre os grupos, a exposição aos herbicidas promoveu diminuição da área dos ácidos em comparação ao grupo controle. Embora haja diferença entre os tratamentos glifosato, 2,4-D e associação, não se pode afirmar efeito sinérgico.

**Gráfico 2.** Média do número e média da área ( $\mu\text{m}^2$ ) de ácidos das glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação em comparação ao controle.



Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrões. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

As Tabelas 3 e 4 apresentam, respectivamente, os dados de comportamento higiênico e de mortalidade de abelhas *A. mellifera* expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as duas variáveis estudadas. A Tabela 5 apresenta os resultados da análise de desenvolvimento populacional. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as variáveis cria aberta ( $p = 0,739$ ), cria fechada ( $p = 0,762$ ) e alimento ( $p = 0,587$ ). Também não houve diferença significativa no consumo do alimento pelas colmeias tratadas com xarope de açúcar contaminado ou não com os herbicidas (Tabela 4).

**Tabela 1.** Comportamento higiênico (%) de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação.

Controle	Glifosato	2,4-D	Associação	p value
83,5 ± 1,13	83,1 ± 4,30	82,3 ± 5,90	74,9 ± 7,85	0,183

Valores apresentados como média e desvio-padrão. Não foram observadas diferenças significativas no comportamento higiênico entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Mortalidade semanal e total de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação.

Variável	Controle	Glifosato	2,4-D	Associação	p value
<b>Semana 1</b>	14,3 ± 6,43	23,1 ± 14,3	23,3 ± 10,9	13,1 ± 2,65	0,356
<b>Semana 2</b>	4,58 ± 2,22	6,79 ± 3,54	4,92 ± 0,62	5,50 ± 0,72	0,539
<b>Semana 3</b>	5,67 ± 3,53	5,87 ± 3,24	5,33 ± 1,81	6,83 ± 3,58	0,911
<b>Semana 4</b>	9,79 ± 7,68	6,52 ± 2,01	6,38 ± 2,34	10,2 ± 6,48	0,621
<b>Semana 5</b>	6,08 ± 4,44	7,38 ± 5,00	5,92 ± 3,22	7,92 ± 2,32	0,858
<b>Semana 6</b>	3,50 ± 2,10	4,96 ± 4,35	2,96 ± 0,77	4,17 ± 1,66	0,723
<b>Semana 7</b>	2,67 ± 1,74	5,56 ± 3,09	4,22 ± 1,01	6,46 ± 6,15	0,269
<b>Semana 8</b>	10,9 ± 2,06	6,42 ± 3,80	8,17 ± 1,84	10,8 ± 6,95	0,434
<b>Semana 9</b>	4,11 ± 2,17	3,37 ± 1,36	7,60 ± 3,04	4,96 ± 2,50	0,155
<b>Total</b>	7,04 ± 2,70	8,96 ± 4,01	7,74 ± 2,02	7,86 ± 2,63	0,830

Valores apresentados como média e desvio-padrão. Não foram observadas diferenças significativas na mortalidade entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ).

**Tabela 3.** Desenvolvimento populacional de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação. Valores de área (cm<sup>2</sup>) de cria aberta, cria fechada e de alimento.

Variável	Controle	Glifosato	2,4 - D	Associação
<b>Cria aberta</b>	24,0 (8,25-71,5)	36,5 (16,7-56,0)	32,0 (21,2-52,7)	35,5 (25,2-40,5)
<b>Cria fechada</b>	147,5 (90,7-219,5)	165,5 (113,5-200,7)	127,5 (96,7-187,5)	123,0 (76,7-204,0)
<b>Alimento</b>	70,5 (32,5-114,5)	75,5 (24,7-141,2)	58,0 (18,0-101,2)	44,0 (21,0-95,7)

Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis (Q1-Q3). Não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento populacional entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ).

**Tabela 4.** Consumo do xarope de açúcar (mL) contaminado ou não com os herbicidas glifosato, 2,4 - D e sua associação pelas colmeias de abelhas *Apis mellifera* L. ao longo de seis dias.

Controle	Glifosato	2,4 - D	Associação	p value
1501,0 ± 449,9	1211,2 ± 107,6	882,7 ± 457,3	955,7 ± 270,9	0,106

Valores apresentados como média e desvio-padrão. Não foram observadas diferenças significativas no consumo entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ).

A Tabela 5 apresenta o número de realeiras coletadas e quantas rainhas emergiram para cada tratamento. Já a Tabela 6 apresenta os resultados da morfologia externa de asas, comprimento e peso de rainhas *A. mellifera* recém emergidas. Não houve produção de realeira para o tratamento Associação, portanto não houve coleta



de realeira nem rainha para análises morfométricas. Para as demais variáveis não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

**Tabela 5.** Realeiras de abelhas *Apis mellifera* L. coletadas, número total e porcentagem (%) de rainhas emergidas das realeiras após exposição aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação.

Variável	Realeiras coletadas (n)	Rainhas emergidas (n)	Rainhas emergidas (%)
Controle	5	5	100
2,4-D	4	3	75
Glifosato	7	3	43
Associação	0	0	0

**Tabela 6.** Morfometria de rainhas recém-emergidas de abelhas *Apis mellifera* L. expostas aos herbicidas glifosato, 2,4-D e sua associação. Valores apresentados como média e intervalos interquartis (Q1-Q3).

Variável	Controle	Glifosato	2,4 - D	p value
Comprimento total (mm)	144,5 ± 14,8	118,1 ± 19,1	127,1 ± 14,8	0,071
Peso (mg)	176,2 ± 30,8	141,2 ± 0,60	158,7 ± 28,7	0,355
Comprimento asa (mm)	9,33 ± 0,23	9,09 ± 0,76	9,42 ± 0,72	0,744
Altura da asa (mm)	2,95 (2,93 – 3,01)	3,07 (2,79 – 3,23)	2,96 (2,69 – 3,10)	0,765

Valores apresentados como média e desvio-padrão (distribuição normal) ou mediana e intervalo interquartis (Q1-Q3) (distribuição não normal). Não foram observadas diferenças significativas no comportamento higiênico entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, observou-se que doses subletais dos herbicidas glifosato, 2,4-D e suas associações promoveram alterações na área e altura das glândulas mandibulares e também na área das glândulas hiporafingeanas, tanto em herbicidas isolados quanto associados. Por outro lado, os herbicidas testados isoladamente e em associação não afetaram o número de ácidos das glândulas hipofaringeanas, comportamento higiênico, desenvolvimento populacional ou mortalidade das abelhas *Apis mellifera*.

Doses subletais dos herbicidas glifosato e 2,4-D causaram alterações no desenvolvimento das glândulas mandibulares de abelhas *Apis mellifera* africanizadas nutrizas, confirmadas pelo aumento da área e redução da altura das células epiteliais nas glândulas mandibulares por ambos herbicidas isolados, havendo uma tentativa

de compensar a redução da altura, sendo assim, embora tenha havido alteração na glândula, a quantidade de secreção não é comprometida (FAITA et al, 2018). A combinação de glifosato com 2,4-D reduziu o volume do reservatório enquanto aumentou a altura das células, indicando um efeito sinérgico desses herbicidas.

Quanto às glândulas hipofaríngeas, embora o número total de ácidos não tenha sido afetado, houve diminuição da área dos ácidos expostos aos herbicidas individualmente e combinados. No entanto, não foram observados efeitos aditivos ou sinérgicos da combinação de glifosato e 2,4-D no desenvolvimento da glândula, possivelmente relacionado à redução da área de ácidos observada na exposição do glifosato ou 2,4-D isolados, assim como observado por Zaluski et al. (2017) para outros pesticidas. Os dados do presente trabalho reforçam estudos prévios que mostram comprometimento da glândula hipofaríngea em abelhas expostas a agrotóxicos em laboratório e campo (ANVISA, 2003; SMODIŠ ŠKER; GREGORC, 2010; HEYLEN et al., 2011; HATJINA. et al., 2013; RENZI et al., 2016; DE SMET et al., 2017; FAITA et al., 2018).

Considerando a importância dessas glândulas alimentares à nutrição da colônia, por meio da produção de geleia real tanto para as larvas como para os indivíduos adultos na colmeia (KNECHT; KAATZ, 1990; CRAILSHEIM, 1992), os resultados sustentam que a exposição oral de abelhas operárias a doses subletais de agrotóxicos, glifosato e 2,4-D no caso deste trabalho, produzem efeitos negativos nas abelhas que podem comprometer a sobrevivência a longo prazo de suas colônias (HATJINA et al., 2013; RENZI et al., 2016; ZALUSKI et al., 2017; FAITA et al., 2018; MILONE et al., 2021). Alterações nas glândulas podem prejudicar o cuidado da prole ao impactar a composição nutricional, a quantidade e/ou qualidade da geleia real, interferindo no desenvolvimento da rainha, na diferenciação de castas, no desenvolvimento de abelhas e na manutenção de colônias (VANENGELSDORP; MEIXNER, 2010; SCOFIELD; MATTILA, 2015; LEE et al., 2015; MILONE et al., 2021).

Estudos demonstraram que restringir o acesso das operárias a nutrientes durante o desenvolvimento pode levar a problemas físicos e comportamentais quando adultas (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2010). Este trabalho sugere que os efeitos causados pelos herbicidas nas glândulas estudadas são semelhantes aos efeitos da má nutrição na colônia e no desenvolvimento dessas glândulas (PENG; JAY, 1979;

DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015). Também já foi observado que abelhas nutrizes com as glândulas hipofaringeas comprometidas podem se tornar forrageadoras mais rapidamente (SMODIŠ ŠKER; GREGORC, 2010). A antecipação do forrageamento em abelhas está associada à redução no número de abelhas nutrizes, poucas crias e menor tempo de vida (BOTÍAS et al., 2015; RENZI et al., 2016).

Outro possível efeito dos herbicidas avaliados seria sobre a microbiota intestinal das abelhas, importante na digestão de alimentos e fornecimento de nutrientes para as atividades das abelhas (ENGEL et al., 2012; KWONG et al., 2014; LEE et al., 2015). Como o glifosato atua inibindo a enzima EPSPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), alguns microorganismos da microbiota intestinal das abelhas podem ser afetados pelo herbicida indiretamente; este fato poderia afetar a digestão das abelhas e, conseqüentemente, a obtenção adequada de nutrientes para o pleno desenvolvimento das glândulas produtoras de geleia real, o que explicaria os resultados observados neste trabalho (KRÜGER et al., 2013; SHILO et al., 2016; MOTTA et al., 2018; BLOT et al., 2019; MOTTA et al., 2020; TAN et al., 2022).

Em relação ao desenvolvimento populacional, apesar de não ter sido observada alteração no desenvolvimento das colônias, isso se deu provavelmente devido ao curto período de exposição e baixas doses dos pesticidas utilizados, assim como observado por Zaluski et al. (2015). Entretanto, os resultados fornecem evidências de que a exposição aos herbicidas por um curto período (seis dias) resulta em mudanças claras nas glândulas mandibular e hipofaringeana das abelhas nutrizes (WU-SMART; SPIVAK, 2016).

Quanto ao comportamento higiênico, ao analisar as porcentagens com base no que se considera uma colônia como higiênica, acima de 75% de retirada dos opérculos para limpeza, observamos que as colmeias dos tratamentos Controle, Glifosato e 2,4-D estão acima dessa taxa, enquanto as colmeias do tratamento Associação estão no limite de 74,9% (EREZ et al., 2022). No entanto, estatisticamente não foi observada diferença entre os tratamentos. Dessa forma, o período de exposição aos herbicidas pode ser considerado curto também para a avaliação do comportamento higiênico (WU-SMART; SPIVAK, 2016).

Thompson et al. (2016) também não encontraram efeitos do glifosato na sobrevivência da cria, assim como não foram observados efeitos letais em abelhas

tratadas com glifosato a 35mg/L, abaixo da dose utilizada no presente trabalho (ZHU et al., 2014). Quando expostas, em laboratório, à metade da concentração comercial de glifosato (178 g/L), acima da utilizada neste trabalho, abelhas adultas de *A. mellifera* e da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*, tendem a morrer rapidamente (RUIZ-TOLEDO; SÁNCHEZ-GUILLÉN, 2014), entretanto, não houve diferença na mortalidade entre grupos quando os testes foram realizados com uma dose menor (400 µg/L) do herbicida.

No trabalho de Nocelli et al (2019), em abelhas *Melipona scutellaris* contaminadas com 2,4-D, houve diferença na mortalidade quando avaliada a dose de aplicação em campo, mas não para o uso de metade dessa concentração, como exposto por Battisti et al. (2021), ao discutir que a concentração da dose pode ser um fator que determina o efeito. Para os componentes avaliados neste trabalho, comportamento higiênico, desenvolvimento populacional e mortalidade, as doses utilizadas de ambos herbicidas não influenciaram estas variáveis avaliadas.

Neste estudo foram utilizadas apenas formulações comerciais de glifosato e 2,4-D por representarem mais realisticamente o tipo de aplicação que é feita e a forma de intoxicação das abelhas no campo, além disso, se considera alguns ingredientes inertes que também podem ter efeitos tóxicos para as abelhas (CHAUZAT et al., 2011). Uma melhor indicação dos ingredientes inertes presentes nas formulações comerciais pode permitir uma avaliação de risco mais adequada dessas substâncias para as espécies não-alvo (CHAUZAT et al., 2011; ZALUSKI et al., 2015).

Embora no presente trabalho o número de realeiras e rainhas emergidas tenham sido baixos e, portanto, não houve um número amostral para a análise estatística, ao se observar a porcentagem de rainhas recém emergidas para o número de realeiras coletadas, nota-se que os herbicidas isolados afetam essa taxa de emergência, que é pequena. No entanto, quando da associação do glifosato e 2,4-D, sequer houve construção de realeiras. Assim como no trabalho de Degrandi-Hoffman et al (2013), no qual a taxa de rainhas emergidas foi afetada pelo uso isolado de agrotóxico, mas principalmente pela sua associação com outro.

Nesse mesmo trabalho (DEGRANDI-HOFFMAN et al, 2013), as larvas selecionadas para indução de rainhas, que foram alimentadas com pólen contaminado, não só emergiram menos das realeiras, como também tiveram mais

resultados positivos para infecção por alguns vírus. Além da exposição ao agrotóxico reduzir a probabilidade de uma colônia criar com sucesso uma rainha, o comprometimento imunológico e conseqüente aumento de chance de doenças é um agravante que pode levar a colmeia ao declínio.

Apesar da assimetria morfológica ser comum e considerada como um indicador sensível de comprometimento do desenvolvimento de abelhas (SCHNEIDER et al.; 2003; MAZEED, 2011; BRETTEL et al, 2017), não foram identificadas variações morfológicas nas asas, no peso ou comprimento corporal das rainhas recém-emergidas coletadas. Os parâmetros morfométricos como asas são estruturas adequadas para avaliar os efeitos da exposição a agrotóxicos em abelhas *Apis mellifera* (POQUET et al. 2015), assim como agentes tóxicos, como os agrotóxicos podem sim afetar a simetria de organismos bilaterais e interferir no desenvolvimento normal (MARTIN et al. 2013), como já relatado para as abelhas *Bombus terrestris*, *Scaptotrigona aff. depilis* e *M. q. anthidioides* (WHITEHORN et al. 2012; LAYCOCK et al. 2012; ROSA et al. 2016; PRADO-SILVA et al., 2018). No entanto, no presente trabalho o número amostral pode ser considerado pequeno.

Segundo Wang et al. (2014), através da entrega de alimento, as abelhas nutrizas conseguem controlar o crescimento larval e o número de ovariolos, sendo que a resposta das larvas ao alimento difere de acordo com seu estágio de desenvolvimento e o genótipo. Por exemplo, a massa corporal das larvas é mais sensível à nutrição durante o primeiro e quarto ínstar e o número de ovariolos foi mais sensível no quinto instar. Considerando o resultado obtido para o efeito dos herbicidas nas glândulas mandibulares e hipofaringeas, pequenas alterações na produção e oferecimento de geleia real fornecida durante as fases larvais têm a capacidade de afetar a produção e produtividade de rainhas.

Como as abelhas podem ser expostas a vários agrotóxicos por um período maior no campo e com mais chances de interações entre os agrotóxicos, que são transportados e armazenados dentro das colmeias, exercendo efeitos sinérgicos e prolongados na dinâmica das colmeias (GOULSON et al., 2015), pode ocorrer a potencialização dos danos às glândulas hipofaringeas, glândulas mandibulares e rainhas (FAITA et al, 2018). Considerando a importância dos polinizadores para a manutenção do equilíbrio de diferentes ecossistemas e produção de alimentos em

agroecossistemas, é urgente que agências reguladoras e políticas públicas levem em consideração os efeitos adversos baseados em evidências como a deste trabalho sobre as abelhas.

Os estudos sobre os efeitos toxicológicos do glifosato em abelhas, especialmente para morfometria ainda são escassos (BATTISTI, 2021) e muitos trabalhos com 2,4-D são antigos. Assim, novas avaliações são necessárias, incluindo mais parâmetros de avaliação como esses, e até a repetição do mesmo para coleta de mais realeiras, de forma que se possa ponderar os efeitos subletais desses agrotóxicos em diferentes castas e aspectos morfológicos, e possivelmente avaliando o efeito a longo prazo na colmeia, para observar os efeitos cumulativos do resíduo desses agrotóxicos estocados e utilizados pela colmeia (KRUPKE et al. 2012). A partir dos resultados deste estudo, destaca-se a necessidade de mais pesquisas, incluindo um número amostral maior e também a associação dos herbicidas para avaliar de forma mais realista a toxicidade do glifosato, 2,4-D e suas combinações em abelhas.

## **CONCLUSÃO**

O avanço científico revelado no presente estudo sustenta que doses subletais dos herbicidas testados causam danos às glândulas hipofaringeanas e mandibulares de abelhas nutrizas *Apis mellifera*, podendo interferir na qualidade da geleia real, além de prejudicarem a produção de realeiras e conseqüentemente de rainhas de *Apis mellifera*, o que pode comprometer a sobrevivência a longo prazo das colônias.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-SHAARA, Hossam F. et al. Body morphological characteristics of honey bees. **Agricultura**, v. 10, n. 1-2, p. 45-49, 2013.
- ACCORTI, M.; LUTI, F.; TARDUCCI, F. Methods for collecting data on natural mortality in bee. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 3, n. sup1, p. 123-126, 1991.
- AL-TIKRITY W.S. et al. A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. *American Bee Journal*, v.111, p.20-6, 1971.
- AKYOL, Ethem; YENINAR, Halil; KAFTANOGLU, Osman. Live weight of queen honey bees (*Apis mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 81, n. 2, p. 92-100, 2008.
- AMARANTE JUNIOR, O.P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.
- ANVISA, RE899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE nº**, v. 899, 2003.
- ATKINS, E. L.; KELLUM, D. Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. **Journal of Apicultural Research**, v. 25, n. 4, p. 242-255, 1986.
- BATTISTI, L. et al. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. **Science of The Total Environment**, v. 767, p. 145397, 2021.
- BLOT, N. et al. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0215466, 2019.
- BOTÍAS, Cristina et al. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 21, p. 12731-12740, 2015.
- BRETTELL, L E. et al. A comparison of deformed wing virus in deformed and asymptomatic honey bees. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 28, 2017.
- CHAUZAT, M. et al. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 103-111, 2011.
- CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of comparative physiology B*, v. 162, n. 8, p. 681-689, 1992.
- CRAILSHEIM, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, v. 29, n. 1-2, p. 97-112, 1998.
- DA CUNHA, A.R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, p. 1-11, 2009.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G. et al. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 9, p. 1184-1191, 2010.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G. et al. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; SIMONDS, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v. 4, n. 1, p. 71-89, 2013.

- DELLICOUR, Simon et al. Distribution and predictors of wing shape and size variability in three sister species of solitary bees. **PloS One**, v. 12, n. 3, p. e0173109, 2017.
- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 49-57, 2005.
- DE SMET, L. et al. Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171529, 2017.
- DINGHA, Beatrice N.; MOAR, William J.; APPEL, Arthur G. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological Entomology**, v. 29, n. 5, p. 409-418, 2004.
- ENGEL, P.; MARTINSON, V.G.; MORAN, N.A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. 11002-11007, 2012.
- EREZ, T. et al. Multiple benefits of breeding honey bees for hygienic behavior. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 193, p. 107788, 2022.
- FAITA, M.R. et al. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. **Chemosphere**, v. 211, p. 566-572, 2018.
- GARCIA, R.C. et al. Honey and propolis production, hygiene and defense behaviors of two generations of Africanized honey bees. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 74-81, 2013.
- GERARD, M. et al. Stressful conditions reveal decrease in size, modification of shape but relatively stable asymmetry in bumblebee wings. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- GÉRARD, M. et al. Impact of crop exposure and agricultural intensification on the phenotypic variation of bees. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 338, p. 108107, 2022.
- GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.
- HALM, M. et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). **Environmental science & technology**, v. 40, n. 7, p. 2448-2454, 2006.
- HATJINA, F. et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 467-480, 2013.
- HEYLEN, K. et al. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 103-116, 2011.
- HOFFMANN, Ary A.; COLLINS, Eveline; WOODS, Richard. Wing shape and wing size changes as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths: comparing shifts in means, variances, and asymmetries. **Environmental Entomology**, v. 31, n. 6, p. 965-971, 2002.
- HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K.. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of insect Physiology**, v. 44, n. 10, p. 929-939, 1998.
- JOHNSON, R.M. et al. Pesticides and honey bee toxicity—USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.
- JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 415-434, 2015.



- KAFTANOĞLU, O., E. AKYOL, AND H. YENINAR. 2000. The effects of juvenile hormone analog on the development time and the quality of queen honeybees (*Apis mellifera* L.). II. International Congress on Africanized Honeybees and Bee Mites. Edited by Erickson, Page and Hanna. The A.I. Root Co., Medina, Ohio. pp. 351–357.
- KAIRO, G. et al. Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.
- KLEIN, A. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.
- KNECHT, D.; KAATZ, H.H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 457-468, 1990.
- KRÜGER, M. et al. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. **Anaerobe**, v. 20, p. 74-78, 2013.
- 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.
- KWONG, W.K. et al. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11509-11514, 2014.
- LACK, Justin B. et al. Decanalization of wing development accompanied the evolution of large wings in high-altitude *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 4, p. 1014-1019, 2016.
- LANDIM, C.C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 408 p.
- LAYCOCK, Ian et al. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1937-1945, 2012.
- LEE, K.V. et al. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie**, v. 46, n. 3, p. 292-305, 2015.
- LUNARDI, J.S.. Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de *Apis mellifera* L. 2018.
- MARTIN, Stephen J.; BALL, Brenda V.; CARRECK, Norman L. The role of deformed wing virus in the initial collapse of varroa infested honey bee colonies in the UK. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 5, p. 251-258, 2013.
- MAZEED, Adel MM. Anomalies and asymmetry of wing venation pattern in Carniolan and Egyptian bee populations in Egypt. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology**, v. 4, n. 1, p. 149-161, 2011.
- MOSTAJERAN, M. A.; EDRISS, Mohammad Ali; BASIRI, Mohammad Reza. Analysis of colony and morphological characters in honey bees (*Apis mellifera* meda). **Pak. J. Biol. Sci**, v. 9, n. 14, p. 2685-2688, 2006.
- MOTTA, E.V.S; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305-10310, 2018.
- MOTTA, E.V.S. et al. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 18, p. e011150-20, 2020.
- MILONE, J.P. et al. Colony-level pesticide exposure affects honey bee (*Apis mellifera* L.) royal jelly production and nutritional composition. **Chemosphere**, v. 263, p. 128183, 2021.

- NOCELLI, R.C. et al. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. **Semana dos Polinizadores**, v. 3, 2012.
- PENG, Y.S.; JAY, S.C. Larval rearing by worker honey bees lacking their mandibular glands: II. rearing by larger numbers of worker bees. **The Canadian Entomologist**, v. 111, n. 1, p. 101-104, 1979.
- PETERS, L.; ZHU-SALZMAN, K.; PANKIW, T. Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 2, p. 132-137, 2010.
- PINTO, Nelson Silva et al. The size but not the symmetry of the wings of *Eulaema nigrita* Lepeletier (Apidae: Euglossini) is affected by human-disturbed landscapes in the Brazilian Cerrado Savanna. **Neotropical entomology**, v. 44, n. 5, p. 439-447, 2015.
- POQUET, Yannick et al. Wings as a new route of exposure to pesticides in the honey bee. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 9, p. 1983-1988, 2015.
- POTTS, S.G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- PRADO-SILVA, Arlete et al. Morphogenetic alterations in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) associated with pesticides. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 74, n. 4, p. 627-632, 2018.
- RAHMAN, S.; THANGKHIEW, I.; HAJONG, S.R. Hypopharyngeal gland activity in task-specific workers under brood and broodless conditions in *Apis cerana indica* (Fab.). **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 59, 2014.
- RAMOS, H.H.; DURIGAN, J. C. Avaliação da eficiência da mistura pronta de glyphosate+ 2, 4-D no controle da *Commelina virginica* L. em citros. **Planta Daninha**, v. 14, p. 33-41, 1996.
- RENZI, M.T. et al. Combined effect of pollen quality and thiamethoxam on hypopharyngeal gland development and protein content in *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 779-788, 2016.
- RINDERER, T. E. et al. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. **Apidologie**, v. 32, n. 4, p. 381-394, 2001.
- 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, n. 1, p. 71-83, 2005.
- ROSA, Annelise de Souza et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729-738, 2016.
- 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 zoológica mexicana**, v. 30, n. 2, p. 408-413, 2014.
- SCOFIELD, H.N.; MATTILA, H.R. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. **Plos one**, v. 10, n. 4, p. e0121731, 2015.
- SHILO, T. et al. Mechanism of glyphosate control of *Phelipanche aegyptiaca*. **Planta**, v. 244, n. 5, p. 1095-1107, 2016.
- SCHNEIDER, S. S. et al. The influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. **Evolution**, v. 57, n. 10, p. 2350-2364, 2003.
- SMODIŠ-ŠKERL, M.I.S.; GREGORC, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v. 41, n. 1, p. 73-86, 2010.

- SONG, Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.
- SPIVAK, M.; DANKA, R.G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 1-16, 2021.
- SPIVAK, M; GILLIAM, M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. **Journal of Apicultural Research**, v. 32, n. 3-4, p. 147-157, 1993.
- SUZUKI, J.B. Rotulagem de transgênicos no Brasil: o retrocesso do PL nº 4.181/08. **Revista de Direito**, v. 9, n. 1, p. 95-123, 2017.
- TAN, S. et al. Effects of glyphosate exposure on honeybees. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 90, p. 103792, 2022.
- THOMPSON, H.; CAMPBELL, P.. Comment on "Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees". **Environmental science & technology**, v. 50, n. 3, p. 1628-1629, 2016.
- VANENGELSDORP, 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. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S80-S95, 2010.
- WANG, Y. et al. Nurse bee behaviour manipulates worker honeybee (*Apis mellifera* L.) reproductive development. **Animal behaviour**, v. 92, p. 253-261, 2014.
- WHITEHORN, Penelope R. et al. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 351-352, 2012.
- WOYKE, J. 1971. Correlations between the ages at which honeybee brood was grafted, characteristics on the resultant queens and result of insemination. *Journal of Apicultural Research* 10(1):45–55.
- WU-SMART, J.; SPIVAK, M.. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- 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. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1062-1069, 2015.
- ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L.A.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J.F. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences**, v. 1, n. 2, p. 125, 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.
- ZUANAZZI, N.R.; DE CASTILHOS GHISI, N.; OLIVEIRA, E.C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2, 4-D herbicide toxicity: a scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, p. 125016, 2020.

-----