

Márcia Regina Fanta

**EFEITOS DO HERBICIDA ROUNDUP® NA SOBREVIVÊNCIA
E DINÂMICA DE COLÔNIAS DE *Apis mellifera***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Inácio Orth

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

FAITA, MARCIA REGINA
EPRITOS DO HERBICIDA ROUNDUP® NA SOBREVIVÊNCIA E
DINÂMICA DE COLÔNIAS DE APIS MELLIFERA / MARCIA
REGINA FAITA ; orientador, Afonso Inácio Orth,
2018.
134 p.

tese (doutorado) - universidade federal de santa
catarina, centro de ciências agrárias, programa de
pós-graduação em recursos genéticos vegetais,
vitorianópolis, 2018.

inclui referências.

1. recursos genéticos vegetais. 2. glifosato. 3.
contaminação. 4. neosemosa. 5. glândulas hipofaríngeas.
i. orth, Afonso Inácio . ii. universidade Federal
de santa catarina. programa de pós-graduação em
recursos genéticos vegetais. iii. título.

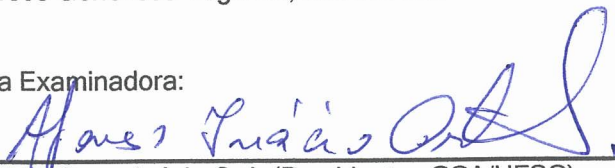
Efeitos do herbicida Roundup® na sobrevivência e dinâmica de colônias de *Apis mellifera*

por

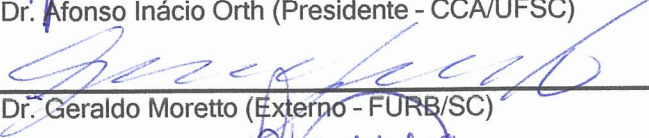
Márcia Regina Fanta

Tese julgada e aprovada em 28/03/2018, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

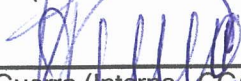
Banca Examinadora:



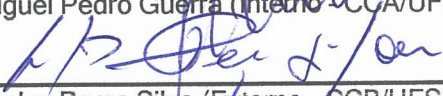
Prof. Dr. Afonso Inácio Orth (Presidente - CCA/UFSC)



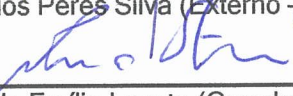
Prof. Dr. Geraldo Moretto (Externo - FURB/SC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Carlos Peres Silva (Externo - CCB/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Proj^a. Neusa Steiner
Subcoordenadora do Programa de P.G. em
Recursos Genéticos Vegetais/CCA/UFSC
Portaria 2384/2015/GP

Florianópolis, março de 2018

Esta tese é dedicada àquelas pessoas que...

...acreditam, lutam e conquistam.

...respeitam todas as formas de vida.

...são capazes de aprender e ensinar.

...compreendem que errar é uma das etapas da aprendizagem e não desistem.

AGRADECIMENTOS

É com satisfação que agradeço a todos que, de alguma forma, oportunizaram a realização do meu curso de doutorado, em especial:

Ao meu Orientador, Professor Dr. Afonso Inácio Orth pela confiança em mim depositada e por compartilhar seu conhecimento e experiências durante as etapas deste trabalho.

Ao Professor Valter Vieira Alves-Junior, com quem tive a oportunidade de trabalhar como orientada durante o curso de mestrado e que muito me incentivou a continuar as pesquisas com insetos sociais. Sempre disposto a me ajudar também durante o doutoramento, suas contribuições foram de extrema importância.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais que sempre se mostraram dispostos a ajudar nos momentos necessários e pela contribuição nas horas de estudos. Quero agradecer particularmente à Marcos Leandro dos Santos pelo companheirismo, por sempre conseguir compartilhar sua serenidade e proporcionar momentos de descontração ímpares. À Morgana Lopes pela lealdade e ótimas conversas que contribuíram imensamente para meu crescimento pessoal e profissional. À Rosenilda Sousa e Wagner Bastos pela amizade e afeto fraterno demonstrados nestes anos de convivência, além das ajudas estratégicas no suporte estatístico. À Kelly Besen pelas boas conversas e valiosas dicas para melhoria deste documento.

Às também colega de pós-graduação e de laboratório Lucilene de Abreu e Mayara Martins Cardozo, os estudantes de graduação Dylan Tomas Teles, Yasmin Sbruzzi e Luiz Fernando Zanfelici por todas as contribuições no desenvolvimento das análises deste estudo, pelas trocas de conhecimento e parceria de sucesso que foi poder trabalhar com todos vocês. Ao Professor Cesar Butignol pelas dicas e conversas esclarecedoras e a Willian Costa, pelo suporte e auxílio nos trabalhos no apiário.

À Eliana de Medeiros pela dedicação e paciência, compartilhando comigo seus conhecimentos e contribuindo decisivamente em todas as etapas de microscopia deste trabalho.

Ao Professor Gustavo Micke que disponibilizou seu laboratório para as análises de resíduos e, especialmente, ao doutorando Victor Rodrigues Alves que não mediu esforços para que conseguíssemos realizar todos os trabalhos em tempo hábil.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de aprendizagem e de crescimento, em especial ao Professor Rubens Nodari pelo apoio constante e a secretária Bernadete Ribas pela compreensão e disponibilidade em ajudar.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro.

Aos meus pais Ivanise e Deonildo, irmãos Flávia e Fabrício, cunhados e sobrinhos, por todo suporte necessários para que eu pudesse iniciar e continuar este doutoramento. Destaco as valorosas contribuições do meu irmão e sua disponibilidade em me ouvir e auxiliar sempre.

Finalmente, meu especial agradecimento aos meus filhos João Vinícius e Vítor Gabriel, pela paciência e compreensão enquanto estive ausente, por fazer perceber que eu tenho toda a força que preciso para lutar pelo que acredito, por ensinar que eu não estou sozinha neste mundo e qual é o verdadeiro significado de amar. Sem vocês, eu nada seria!

Sou imensamente grata a todos e todas!

Resumo

A crescente redução dos polinizadores, principalmente das abelhas da espécie *A. mellifera*, traz graves consequências para o meio ambiente e na produção de alimentos. Considerados como bioindicadores ambientais, as abelhas estão sendo expostas a doses residuais de muitos produtos tóxicos, cuja sinergia com parasitas e patógenos, tem efeitos devastadores para estes insetos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do herbicida Roundup® na sobrevivência de colônias de *A. mellifera* a partir da contaminação de produtos da colmeia, da sinergia do herbicida com microsporídeo *Nosema* sp. e alterações das glândulas hipofaríngeas. As análises de resíduos indicaram a presença de glifosato nas amostras de mel das colmeias expostas experimentalmente ao herbicida (R1 $8,45 \pm 1,09 \mu\text{g/g}^{-1}$; R2 $8,15 \pm 2,14 \mu\text{g/g}^{-1}$; R3 $23,90 \pm 2,95 \mu\text{g/g}^{-1}$) após uma semana do fornecimento da última alimentação artificial. Em amostra de colmeia alimentada há mais de quatro semanas, o glifosato também estava presente, mesmo que em concentrações menores ($3,12 \pm 0,89 \mu\text{g/g}^{-1}$). A partir do método utilizado, não foi identificada a presença do metabólito do glifosato, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em nenhuma das amostras, dentro dos limites de detecção. Não foi possível estabelecer um método robusto para determinar a presença de glifosato ou AMPA em amostras de pólen, a partir das técnicas utilizadas. Análises qualitativas revelaram que as colmeias do tratamento controle, onde não havia resíduos do herbicida, permaneceram em boas condições durante todo o período de avaliações, com presença de rainha e alta população de operárias. Porém, as colmeias submetidas a alimentação contendo Roundup® apresentaram redução significativa na população de indivíduos adultos e na área de cria, além de ausência de rainha sem a construção de realeiras pelas operárias. Para os bioensaios onde foi avaliado a interação entre o Roundup® e o microsporídeo *Nosema* sp. em condições de laboratório, os resultados indicaram que estes agentes estressores exercem efeito aditivo sobre as abelhas, contribuindo significativamente para a redução da sobrevivência de operárias adultas de *A. mellifera*, com aumento do consumo de alimento. A partir destes resultados, é possível determinar que em condições naturais, essa interação pode comprometer a sobrevivência da colônia, como foi observado no bioensaio a campo. Os resultados das avaliações nas glândulas hipofaríngeas indicam que o Roundup® promoveu alterações na ultraestrutura celular destas glândulas, promovendo sua degeneração precoce, com desestruturação do retículo endoplasmático rugoso e mudanças morfológicas e estruturais nas mitocôndrias, compatíveis com eventos celulares associados a depleção

de ATP. A quantidade de geleia real produzida não apresentou redução significativa, embora sejam necessários estudos adicionais para determinar possíveis alterações qualitativas da mesma, que poderiam comprometer a nutrição de vários indivíduos da colônia, principalmente a rainha e larvas de até três dias de vida. Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do Roundup® na sobrevivência de colônias de *A. mellifera*, sob diferentes aspectos, os quais estão diretamente relacionados com a estabilidade das colmeias, que são a interação com patógenos e alterações das glândulas produtoras de geleia real.

Palavras-chave: Glifosato. Contaminação. Nosemose. Interação. Mortalidade. Glândulas hipofaríngeas. Ultraestrutura.

Abstract

The increasing reduction of pollinators, especially bees of the species *A. mellifera*, has crucial consequences for the environment and food production. Considered as environmental bioindicators, bees are being exposed to residual doses of many toxic products, whose synergy with parasites and pathogens has devastating effects on these insects. The objectives of this work were to evaluate the effects of the Roundup®, a glyphosate based herbicide, on the survival of colonies of *A. mellifera* from the contamination of hive products, the synergy of the herbicide with microsporidium *Nosema* sp. and changes in the hypopharyngeal glands. The residue analyzes indicated the presence of glyphosate in honey samples from hives experimentally exposed to the herbicide (R1 $8,45 \pm 1,09 \mu\text{g/g}^{-1}$, R2 $8,15 \pm 2,14 \mu\text{g/g}^{-1}$, R3 $23,90 \pm 2,95 \mu\text{g/g}^{-1}$) after one week of the last artificial feeding. In a hive sample fed for more than four weeks, glyphosate was also present, even at lower concentrations ($3,12 \pm 0,89 \mu\text{g/g}^{-1}$). In addition, the presence of the glyphosate metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), was not identified in any of the samples within the limits of detection of the method used. Nevertheless, it was not possible to establish a robust method to determine the presence of glyphosate or AMPA in pollen samples from the techniques used. Qualitative analyzes revealed that control hives, where there was no herbicide residues, remained in good condition throughout the assessment period, with the presence of queen and high worker population. However, the hives submitted to feeding containing Roundup® presented a significant reduction in the adult population and in the breeding area, besides the absence of queen without the construction of retreads by the workers. In laboratory bioassays involving both Roundup® and the microsporidium *Nosema* sp., the results indicated that the herbicide enhanced the effect of *Nosema* sp. on the bees, contributing significantly to the reduction of the survival of adult workers of *A. mellifera*, and increased food consumption as well. Based on these results, it is possible to determine that under natural conditions, this interaction may compromise the survival of the colony, as verified in the field bioassay. The Roundup® also triggered alterations in the cellular ultrastructure of hypopharyngeal glands, promoting their early degeneration, with ultrastructural changes of the rough endoplasmic reticulum, and morphological and structural changes in the mitochondria, compatible with cellular events associated with ATP depletion. The amount of royal

jelly produced did not show significant reduction, although additional studies are necessary to determine its qualitative alterations by the exposure to the herbicide, which could compromise the nutrition of several individuals of the colony, especially the queen and larvae of up to three days of life. This is the first study that evaluated the effect of sub-lethal dose of Roundup® on the survival of colonies of *A. mellifera*, different cellular changes, interaction with pathogens and alterations of the royal jelly producing glands, which are directly related to the stability of the hives, which are the.

Keywords: Glyphosate. Contamination. Nosemose. Interaction. Mortality. Hypopharyngeal glands. Ultrastructure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Quantificação das publicações encontradas por grupo de polinizadores. Adaptado de Bibliografia brasileira de polinização e polinizadores (PEREIRA et al., 2006). 28
- Figura 2:** Esquema demonstrando a distinção entre sexos e castas em *A. mellifera*. Adaptado de Peruquetti, R.C. Introdução ao estudo sobre abelhas. Disponível em <http://www.ufac.br/ppgespa/polen>. Acesso: 21 de abril de 2017..... 32
- Figura 3:** Diferentes fases do ciclo de vida das abelhas *A. mellifera*. Fonte: Adaptado de Cardozo, 2014..... 33
- Figura 4:** Morfologia da glândula hipofaríngea de *A. mellifera*. Esquema da cabeça com destaque para a glândula hipofaríngea (A e B). (Adaptado de Macedo, 2009)..... 34
- Figura 5:** Apiário experimental “Cidade das Abelhas”, registrado em 15 de abril de 2016. Foto: Fanta, 2016..... 53
- Figura 6:** Alimentação artificial oferecida às colmeias em alimentadores de superfície. A – Colmeia do grupo controle recebendo alimento energético; B e C – Coletor de pólen de alvado e a gaveta do mesmo, contendo o pólen armazenado durante 24 horas, respectivamente; D e E – Solução fornecida às colmeias do tratamento Roundup® (em alimentador de superfície) e operárias coletando este alimento para armazená-lo no interior da colmeia. Foto: Fanta, 2017..... 55
- Figura 7:** Cromatogramas referentes a (A) padrão de AMPA (cima) e glifosato (baixo) nas concentrações 5 e 6,4 mg mL⁻¹, respectivamente, e (B) amostra de código C8, AMPA (cima) e glifosato (baixo). A fase móvel utilizada foi de ACN: (NH₄)₂CO₃ 10 mmol L⁻¹ em uma coluna Luna NH₂ (150x2,0 mm; 4µm)..... 65
- Figura 8 -** Imagens registradas de favos de colmeias dos tratamentos controle (A) e que receberam Roundup® misturado ao pólen (B-E), registradas após três semanas do início dos bioensaios em 2017. A – área de cria tratamento controle; B – área de cria tratamento Roundup®; C e

D – setas vermelhas indicando algumas das pupas mortas e não removidas pelas operárias; E – crias com diferentes idades de desenvolvimentos; F - Ovos de operárias de *A. mellifera* em colmeia órfã, observada 24 horas após tentativa frustrada de introdução de rainha em colmeia tratada com Roundup® no ano de 2016. Fonte: Fanta, 2016 e 2017..... 70

Figura 9: Dados da frequência média da sobrevivência de *A. mellifera* expostas a alimentação com ou sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp., após a emergência, submetidas a diferentes tratamentos em BOD. 80

Figura 10: Dados da frequência média da sobrevivência de *A. mellifera* oriundas de colmeias que receberam alimentação com ou sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp., 40 dias antes do início dos testes e que foram submetidas a diferentes tratamentos em BOD. 81

Figura 11: Consumo médio de alimento em cada tempo de observação durante o teste de sobrevivência de abelhas alimentadas com e sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp. 82

Figura 12: Identificação das operárias logo após a imergência (A). Reintrodução das abelhas já identificadas na colmeia (B), Fanta, 2016. C - Obtenção de medidas dos ácinos das glândulas hipofaríngeas com o programa LAS-AF (Leica), Fanta, 2017. 92

Figura 13: Glândulas hipofaríngeas de abelhas com seis dias de idade após a emergência. Micrografias A e B correspondem a glândulas de abelhas de uma colmeia controle e as micrografias B e C, são de indivíduos que receberam alimentação contendo Roundup®. Nestas imagens não foram observadas diferenças nos tamanhos dos ácinos entre os tratamentos, o que foi confirmado a partir das medidas efetuadas. Micrografias obtidas com Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany), capturadas com auxílio do programa LAS-AF Lite (Leica). 95

Figura 14: Glândulas hipofaríngeas de abelhas com idade de seis dias após a emergência. A – glândulas de operária proveniente de colmeia do grupo controle; B- glandulas de abelha operária proveniente de colmeia que recebeu alimento contendo Roundup®, apresentando ácinos túrgidos com aspecto esponjoso. Imagens registradas em Lupa Opticam,

processadas com software Opticam Microscopia OPTHD – 3.7.4103. Aumento de 40x, barra de escala de 1mm. Fonte: Faita, 2017..... 96

Figura 15: Micrografias de cortes de glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera*, com seis dias de idade após a emergência, coradas com azul de toluidina. Os indivíduos do grupo controle estão representados pelas micrografias A e B; Micrografias C e D representam indivíduos do grupo que recebeu alimento contendo Roundup®. Não foram observadas diferenças histológicas entre os indivíduos de cada tratamento. Contudo, as vesículas de geleia real são mais facilmente observadas nas imagens obtidas dos indivíduos do grupo controle. a = ácinos; cc = canalículo coletor; dc = ducto coletor; n = núcleo; vs = vesículas de secreção. Barra de escala 100 µm. 98

Figura 16: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngeana de operárias de *A. mellifera* com seis dias após a emergência. Tratamento controle (A, C, E, G) e tratamento com Roundup® (B, D, F e H); secreção (S); mitocôndrias (M); retículo endoplasmático granular (RER); canal coletor (CC)..... 101

Figura 17: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngeana de operárias de *A. mellifera* com seis dias de idade após a emergência. Tratamento controle (A - C) onde é possível identificar as cristas mitocondriais. Tratamento com Roundup® (D - F) é possível identificar mitôndria em formato de “C” e anelar e alterações na ultraestrutura do REG; retículo endoplasmático granular (REG) ; vesícula de secreção (S); mitocôndrias (M). 104

Figura 18: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngeana de operárias de *A. mellifera* com seis dias de idade após a emergência. Tratamento controle (A e B); Tratamento Roundup® (C e D). Nas micrografias é possível observar o núcleo, com múltiplos nucléolos e carioteca íntegra. Não foram observadas alterações em suas estruturas devido aos tratamentos administrados às abelhas. 105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Transições de quantificação e confirmação monitoradas para o glifosato, seu metabólito AMPA e o padrão interno glufosinato, além das energias otimizadas para as suas análises por espectrometria de massas. Fonte: Fanta, 2018..... 62
- Tabela 2:** Valores para os parâmetros empregados na fonte ESI no processo de ionização do glifosato, AMPA e glufosinato. Fonte: Fanta, 2018..... 63
- Tabela 3:** Concentração de Glifosato e AMPA em mel coletado de colmeias que foram expostas experimentalmente a alimentação contendo Roundup® (R1-R3) ou não (C1-C3)..... 65
- Tabela 4:** Sobrevivência (IS-1) médio de operárias adultas em BOD, submetidas aos tratamentos alimento controle (T1), com adição de Roundup® (T2), Nosema sp. (T3) e Roundup® e Nosema sp. (T4), durante o período de 120 horas. 78
- Tabela 5:** Índice de sobrevivência (IS-2) médio de operárias adultas em BOD, submetidas aos tratamentos alimento controle (T1), com adição de Roundup® (T2), Nosema sp. (T3) e Roundup® e Nosema sp. (T4), durante o período de 120 horas. 78
- Tabela 6:** Consumo médio de alimento (mL), em cinco tempos de avaliação para cada um dos tratamentos, em função dos testes de sobrevivência, durante o período de 120 horas. 82
- Tabela 7:** Quadro de análise de variância da área dos ácinos das glândulas hipofaríngeas (μm^2)..... 94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
1.1 ESTRUTURA DA TESE.....	25
1.2.1 Objetivo Geral	26
1.2.2 Objetivos Específicos	26
2. POLINIZADORES E A ABELHA <i>A. mellifera</i>	27
2.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA	27
2.3 CASTAS E DIVISÃO DE TRABALHO NA COLMEIA	32
2.4 GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS	33
3. AGROTÓXICOS	37
3.1 HERBICIDA ROUNDUP®	37
3.2 EFEITOS DOS AGROTÓXICOS SOBRE ORGANISMOS NÃO ALVOS E EM ABELHAS	41
3.3 RESÍDUO DE AGROTÓXICOS NOS PRODUTOS DA COLMEIA.....	45
4. NOSEMOSE	49
5. MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1 LOCAL E CONDUÇÃO DOS BIOENSAIOS.....	53
5.2. PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS ..	53
5.2.1 Alimento energético: xarope de açúcar invertido	53
5.2.2 Determinação da concentração do herbicida Roundup® utilizada nos bioensaios.	54
5.2.3 Preparo das soluções de alimento fornecidos às colmeias	54
6. CAPÍTULO I	57
ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ROUNDUP® EM MEL E AS IMPLICAÇÕES PARA A SOBREVIVÊNCIA DA COLMEIA	57
6.1 RESUMO.....	57

6.2 INTRODUÇÃO.....	58
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
6.3.1 Local e condução dos bioensaios.....	60
6.3.2 Herbicida utilizado.....	60
6.3.3 Coleta das amostras	61
6.4.4 Detecção do princípio ativo (Glifosato) e de seu principal metabólito (AMPA).....	61
6.3.5 Instrumentação	62
6.3.6 Preparo das amostras	63
6.3.7 Curvas de Calibração	64
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.4.1 Análise de resíduo em mel e pólen	64
6.4.2 Análise qualitativa nas colmeias	67
6.5 CONCLUSÕES.....	71
7. CAPÍTULO 2	73
ÍNDICE DE SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS ADULTAS DE <i>A. mellifera</i> EXPOSTAS A ALIMENTAÇÃO CONTAMINADA COM ROUNDUP® E INFECTADAS POR ESPOROS DE <i>Nosema</i> sp.....	73
7.1 RESUMO	73
7.2 INTRODUÇÃO.....	73
7.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
7.4 RESULTADOS E Discussões.....	77
7.4.1 Índice de sobrevivência.....	77
7.4.2 Consumo de alimento	82
7.4.3 Infecção por <i>Nosema</i> sp.....	83
7.5 CONCLUSÕES.....	84

8. CAPÍTULO 3	87
ALTERAÇÕES EM GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE ABELHAS NUTRIZES (<i>Apis mellifera</i> L.) INDUZIDAS POR DOSES SUBLETAIS DO HERBICIDA ROUNDUP® EM PÓLEN E AS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL	87
8.1 RESUMO.....	87
8.2 INTRODUÇÃO.....	87
8.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
8.3.1 Morfologia e morfometria dos ácinos das glândulas hipofaríngeas	89
8.3.2 Histologia e Ultraestrutura das Glândulas Hipofaríngeas	90
8.3.3 Produção de Geleia Real	92
8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
8.4.1 Morfologia e morfometria dos ácinos das glândulas hipofaríngeas	93
8.4.2 Histologia das Glândulas Hipofaríngeas	96
8.4.3 Ultraestrutura das Glândulas Hipofaríngeas	99
8.4.4 Produção de Geleia Real	106
8.5 CONCLUSÕES	107
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
10. REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A manutenção do equilíbrio em um ecossistema está diretamente relacionada com a reprodução vegetal, devido a sua importância no fornecimento de recursos alimentares (néctar, pólen, sementes e frutos) para a teia de interações nele existentes. De acordo com Imperatriz-Fonseca (2004), a polinização é essencial para a reprodução sexuada das plantas e, na sua ausência, não há manutenção da variabilidade genética entre os vegetais, reduz-se a produção agrícola ou ocorre a formação de frutos deformados. A densidade populacional de muitos polinizadores está sendo reduzida a níveis que podem comprometer os serviços de polinização nos ecossistemas naturais e agrícolas e, conseqüentemente, a manutenção da capacidade reprodutiva de plantas silvestres (KREMEN, 2004). Em ecossistemas naturais, as evidências da polinização insuficiente são mais sutis do que em sistemas agrícolas, mas as conseqüências podem ser tão severas como a extinção de uma espécie vegetal, ou um declínio visível de animais que se alimentam de frutos e sementes, regeneração insuficiente da flora, erosão do solo e redução do volume de água (EARDLEY et al., 2006).

Problemas ambientais como desmatamento, e a agricultura com práticas de cultivo caracterizadas pelo uso abusivo de agrotóxicos, especialmente em áreas de monocultura, vêm impactando as populações de inúmeras espécies de polinizadores em escala global, sobretudo, as abelhas, consideradas como polinizadores mais efetivos, acarretando em grandes prejuízos econômicos e ambientais (FREITAS et al., 2009; ALVES DA SILVA CUNHA et al., 2014;). Muitos destes agrotóxicos não são seletivos, como é o caso dos inseticidas neonicotinóides, associados com a redução das populações de polinizadores em diferentes países (HENRY et al., 2012; WHITEHORN et al., 2012; DI PRISCO et al., 2013; GODFRAY et al., 2014; WOODCOCK et al., 2017) chegando a ser proibido pela União Europeia em 2013 (CARNEIRO, 2015). Além dos inseticidas, existem outros produtos, como herbicidas e fungicidas, cujo efeito sobre as abelhas é pouco estudado por não serem alvo destes agrotóxicos, o que não significa que não prejudiquem as abelhas de algum modo. Produtos denominados ingredientes inertes, presentes nos agrotóxicos, também podem ter efeitos tóxicos sobre abelhas, contribuindo para a diminuição da saúde de suas populações (ZHU et al., 2014; MULLIN et al., 2016).

Os efeitos subletais, provocados pela exposição a pequenas doses de agrotóxicos, que podem provocar alterações genéticas e comportamentais nos indivíduos, são pouco conhecidos e têm sido

desconsiderados nos estudos de risco (MALASPINA; MATHIAS DA SILVA-ZACARIN, 2006). As abelhas estão cronicamente expostas a coquetéis de agroquímicos e a novos parasitas, cuja interação está conduzindo para perdas de suas colônias (GOULSON et al., 2015). A interação de inseticidas neonicotinóides com agentes patogênicos tem efeito negativo potencializado sobre a saúde das abelhas, causando redução na longevidade, diminuição da glicose oxidase (ALAUX et al., 2010) e aumentando a suscetibilidade à infecção por *Nosema ceranae* (WU et al., 2012; PETTIS et al., 2013). Estudos que avaliem as interações de parasitas com outros agrotóxicos, além dos inseticidas, são escassos e nem por isso menos importantes, evidenciando a necessidade de trabalhos nesta área.

Substâncias ingeridas pelas abelhas também exercem influência sobre as glândulas hipofaríngeas, relacionadas com a produção de geleia real e enzimas, substâncias de grande relevância para alimentação da rainha e larvas. A ação de inseticidas neonicotinóides e acaricidas, utilizados respectivamente em lavouras e no interior das colmeias, reduzem o tamanho dos ácinos glandulares devido a morte celular nestas estruturas (ALAUX et al., 2010; SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013). Zaluski, Justulin e Orsi (2017) reportaram alterações claras nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas de abelhas nutrizas, expostas durante seis dias ao fipronil e piraclostrobina. Destacam ainda esses autores que no campo, as abelhas podem ser expostas a múltiplos pesticidas e por mais tempo, sendo que seu resultado pode subestimar o real impacto negativo dos pesticidas em abelhas.

Os agrotóxicos, apontados como os principais causadores de mortes em abelhas, podem ser levados à colônia por diferentes maneiras e de modo contínuo durante a floração (KARISE et al., 2017). Além disso, estes pesticidas acabam sendo armazenados no interior da colmeia, estando disponíveis por longos períodos, tendo efeito crônico sobre as abelhas (SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010). Estudos mais criteriosos e aprofundados sobre os efeitos subletais dos agrotóxicos, destacando a interação destes com parasitas e glândulas exócrinas podem contribuir para o entendimento de eventos observados que comprometem a viabilidade da colmeia, tais como a “Desordem do Colapso da Colônia (DCC)”, embora esse fenômeno provavelmente não tenha uma única causa de ocorrência e, os estudos desenvolvidos em laboratórios não reproduzam as condições de campo para avaliar com maior precisão os efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os impactos da alimentação artificial contendo dose subletal de Roundup®

sobre a dinâmica das colmeias de *A. mellifera*, a partir da interação com o microsporídeo *Nosema* sp., bem como os efeitos sobre as glândulas hipofaríngeas e contaminação de produtos da colmeia.

1.1 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada em três capítulos que correspondem aos trabalhos desenvolvidos durante o período de doutoramento, com seus respectivos resultados e discussões.

Antes destes, a introdução ao tema faz a contextualização do trabalho, apresentando justificativas para o desenvolvimento do estudo e seus objetivos. Na sequência, compondo o referencial teórico, a revisão da literatura traz informações sobre a espécie utilizada como modelo biológico e os fatores apontados como agravantes no declínio dos polinizadores. São apresentadas também, informações sobre a metodologia empregada no desenvolvimento dos trabalhos e que é comum a todos os bioensaios desenvolvidos.

O primeiro capítulo trata da identificação e quantificação de resíduos do Rondup® em mel e dos efeitos deste agrotóxico sobre aspectos qualitativos das colmeias monitoradas em condições de campo.

No segundo capítulo, são apresentados os dados sobre a interação do parasita *Nosema* sp. com o herbicida a base de glifosato, em condições de laboratório. É discutido como a presença simultânea destes agentes estressores afeta a sobrevivência de operárias adultas, estimando-se as implicações para situações de campo.

O terceiro capítulo aborda os efeitos da alimentação contendo Roundup® sobre as glândulas hipofaríngeas, relacionando com as consequências sobre a produção de geleia real e como a soma destes fatores pode interferir na sobrevivência de colônias de abelhas.

Os capítulos que compõem esta tese servirão de base para a elaboração de artigos científicos. Os mesmos serão formatados de acordo com as normas exigidas pelas respectivas revistas às quais serão submetidos.

Ao final, apresenta-se uma conclusão geral dos resultados obtidos, discutindo como cada um deles interfere na dinâmica e sobre vivência de colônias de *A. mellifera* expostas o herbicida Roundup®, contribuindo assim para um maior entendimento das causas da desordem do colapso da colônia. São apresentadas também, algumas perspectivas para estudos futuros, considerando observações feitas durante os bioensaios desenvolvidos no doutorado e que não foi possível de serem avaliados.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do herbicida Roundup® na sobrevivência de colônias de *A. mellifera* a partir do efeito aditivo do herbicida com microsporídeo *Nosema* sp., das alterações das glândulas hipofaríngeas e da contaminação de produtos da colmeia.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a presença de resíduos de glifosato (princípio ativo do Roundup®) seu metabólito (ácido aminometilfosfônico –AMPA) em produtos mel e pólen relacionando com aspectos qualitativos das colmeias em condições de campo.
- Avaliar o índice de sobrevivência de operárias adultas de *A. mellifera* expostas a alimentação contendo concentração de campo de Roundup® e infectadas pelo microsporídeo *Nosema* sp. em condições de laboratório.
- Estudar o efeito da ingestão de concentração subletal de Roundup®, sobre a morfometria, histologia e ultraestrutura das glândulas hipofaríngeas de operárias adultas de *A. mellifera* e a interferência na produção de geleia real.

2. POLINIZADORES E A ABELHA *A. mellifera*

2.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA

A polinização de espécies vegetais em Florestas Tropicais é realizada, em sua maioria, por animais (98%). De acordo com Bawa (1990), esses animais podem ser aves, morcegos, abelhas, mariposas, borboletas, besouros, moscas, vespas, formigas e outros, que visitam as flores para se alimentarem, procurar abrigo ou para a reprodução, e assim, podem carregar grãos de pólen aderidos ao seu corpo e, ao visitarem diferentes flores, transferi-los para o estigma, propiciando a ocorrência da polinização. Entre os agentes polinizadores, os mais abundantes são os insetos que realizam com as plantas uma relação mutualística, um processo coevolutivo, que pode ser observado em diversos ambientes. Embora recebam grande diversidade de visitantes, as flores são polinizadas efetivamente apenas por alguns deles. A relação entre flores e seus polinizadores pode ser interpretada como o resultado das adaptações das estruturas florais, a fim de aperfeiçoar a ação dos vetores no transporte de grãos de pólen (ZEN; ACRA, 2005).

Os grupos de polinizadores são diversificados e as flores que não desenvolveram estruturas específicas para um único visitante, são exploradas por uma grande variedade de animais, principalmente abelhas (PROENÇA; GIBBS, 1994; LUGHADHA; PROENÇA, 1996). No entanto, visitar uma flor não é suficiente para um visitante floral ser considerado como um polinizador (POLATTO et al., 2012). Para ser considerado um polinizador, algumas condições devem ser cumpridas: 1. A proporção de espécies de visitantes vetores de pólen; 2. A frequência com que cada espécie de visitante entra em contato com anteras e estigmas; 3. A frequência de visitas que resultam em deposição do pólen nos estigmas de cada espécie vegetal; 4. O número de grãos de pólen depositados por visita na mesma flor e nas flores subsequentemente forrageadas, favorecendo ou não o fluxo gênico; 5. A quantidade de pólen removido das anteras e depositado nos estigmas; 6. A produção de frutos e de sementes, por visita, para cada espécie de visitante considerada; 7. Fatores intrínsecos da planta, como a viabilidade do pólen e a existência ou não de autocompatibilidade (FENSTER et al., 2004).

Em pesquisas sobre biologia da polinização, frequentemente defende-se a ideia que as interações entre plantas e seus polinizadores são resultantes da evolução convergente dos atributos florais, em relação a pressão exercida pelos polinizadores (JOHNSON et al., 1998; FENSTER

et al., 2004; GOLDBLATT et al., 2004; PÉREZ et al., 2006; ALCANTARA; LOHMANN, 2010; CURTI; ORTEGA-BAES, 2011).

Entre os insetos polinizadores, se destacam as abelhas que apresentam comportamento altamente social, produzem mel e podem ser utilizadas de forma racional para polinização em culturas. A importância das abelhas como polinizadores no Brasil é evidenciada no levantamento de informações acerca do conhecimento técnico-científico sobre polinizadores e polinização, realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (PEREIRA et al., 2006). Nesse trabalho, foram levantadas todas as publicações direta ou indiretamente relacionadas com o uso e manejo de polinizadores no Brasil, indexadas nas mais importantes bases de dados on-line nacionais e internacionais. Ao todo, foram encontradas 2469 publicações, sendo 1745 referindo-se a grupos de polinizadores diferentes. Os valores percentuais que se referem a estas publicações estão representados no gráfico da figura abaixo:

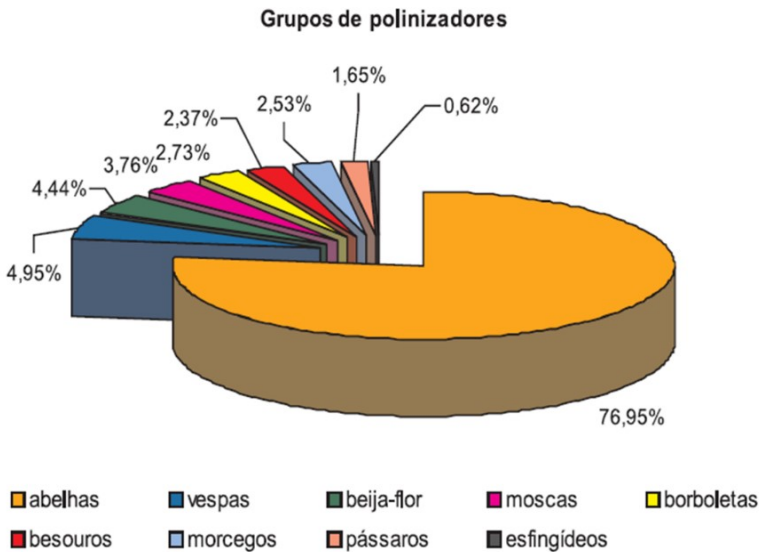


Figura 1: Quantificação das publicações encontradas por grupo de polinizadores. Adaptado de Bibliografia brasileira de polinização e polinizadores (PEREIRA et al., 2006).

Não há dúvida de que os insetos polinizadores mais importantes são as abelhas e as moscas (MALERBO-SOUZA; HALAK, 2009). De acordo com Gulan e Cranston (2007), Mouga et al. (2012) e Toledo et al.

(2013) a *A. mellifera* é considerada em todo mundo a principal abelha polinizadora, cujos serviços são de extrema importância para muitas plantas cultivadas, resultando no aumento de produtividade e qualidade das culturas. O serviço ecossistêmico (polinização) prestado por elas é essencial para a manutenção das populações de plantas nativas e para a produção de alimento para o homem e animais (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

A importância econômica dos polinizadores tem sido reconhecida na agricultura moderna. Uma vasta lista de plantas cultivadas depende totalmente destes animais ou se beneficiam com suas visitas. No caso da polinização por abelhas, por exemplo, é comprovada a melhoria na produtividade em muitas culturas entomófilas (ROUBIK, 2002). Na presença de organismos polinizadores, algumas espécies vegetais aumentam sua produção não só em quantidade, mas também em qualidade dos seus frutos (NASCIMENTO; et al., 2012; TOLEDO et al., 2013). A ausência deste serviço pode afetar negativamente a reprodução sexuada e a diversidade genética das plantas, além de comprometer a produção de alimentos e produtos relacionados (KLEIN et al., 2007).

O valor econômico mundial do serviço de polinização por insetos, principalmente abelhas, foi de 153 bilhões de euros em 2005 para as principais culturas que alimentam o mundo (GALLAI et al., 2009). Nos Estados Unidos, o valor estimado da polinização para a agricultura, apenas pelas abelhas *A. mellifera*, foi de em 9,3 bilhões de dólares em 1989 e 14,6 bilhões em 2000, ou seja, um aumento de 36% (MORSE; CALDERONE, 2000).

No Brasil, as informações disponíveis sobre o uso em grande escala de serviços de polinizadores se concentram nas culturas da soja, algodão, caju, maçã, laranja, maracujá, abacate e melão. Não há relatórios sobre a polinização no café, algodão e soja, apesar dos estudos mostrarem que essas culturas são beneficiadas pela polinização prestada por agentes bióticos (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005). Consequentemente, poucas são as informações sobre as culturas que pagam pelo serviço da polinização. Apenas duas culturas de maior expressão econômica e que dependem do uso de polinizadores vem recorrendo a eles em larga escala no país: a maçã (*Malus domestica*) na região Sul, especialmente Santa Catarina, e o melão (*Cucumis melo*) na região Nordeste, particularmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004).

Estudos realizados por Chiari et al. (2008), com o objetivo de verificar a influência da *A. mellifera* na produção de grãos e qualidade de sementes da soja transgênica *Glycine max* Merrill Roundup® e

convencional, mostraram que, para as cultivares estudadas, houve benefício na produção de grãos de 37,84%, quando foi permitida a visita de abelhas. No cultivo de laranjas, Malerbo-Souza e Halak (2009), relataram a importância da entomofilia na produção desses frutos e afirmam que vários experimentos de polinização em *Citrus* sp comprovaram os benefícios na produção quando as abelhas estão presentes, com aumento na frutificação das flores (MALERBO-SOUZA; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2003) e a produção de frutos maiores, mais doces e com maior quantidade de vitamina C na presença de abelhas, quando comparado ao tratamento sem abelhas (GAMITO; MALERBO-SOUZA, 2006).

De acordo com uma revisão feita por Giannini et al. (2015), a contribuição econômica dos polinizadores totaliza quase 30% (aproximadamente US\$12 bilhões) do valor total da produção agrícola anual das culturas dependentes (totalizando quase US\$45 bilhões). Esses autores utilizaram dados derivados de três fontes: Klein et al. (2007), somente culturas cultivadas no Brasil, Giannini et al. (2015) e dados disponíveis na página eletrônica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) referentes aos anos de 2005 a 2012, incluindo todas as plantas de importância econômica, como plantas utilizadas como alimento, vestuário, gado, biocombustível ou para outro uso. Foi revisada a dependência das culturas por polinizadores e estimado o valor econômico anual da polinização para cada cultura. Foram analisadas 141 culturas, das quais 85 dependem de polinizadores. Quase um terço destas culturas apresentou uma dependência grande ou essencial por polinizadores. Contudo, não foram obtidas informações sobre a dependência de polinizadores para algumas culturas importantes, o que mostra a necessidade urgente por pesquisa básica sobre biologia reprodutiva e ecologia da polinização (GIANNINI et al., 2015).

2.2 ABELHAS AFRICANIZADAS: *Apis mellifera*

As abelhas representam um dos maiores grupos da Ordem Hymenoptera e junto com as vespas Spheciformes constituem a superfamília Apoidea. Estima-se que existam cerca de 20 mil espécies de abelhas, distribuídas por todo mundo onde ocorrem Angiospermas (MICHENER, 2000). A apifauna brasileira é constituída por cinco famílias (Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae) e 1.576 espécies descritas (SILVEIRA; et al., 2002); todavia as estimativas são de que existem aproximadamente 3.000 espécies de abelhas para nosso País.

Das famílias de abelhas existentes no Brasil, a Apidae é considerada a mais diversificada, formada por espécies corbiculadas pertencentes às tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini e não-corbiculadas, as tribos Antophorini, Xylocopini, Centridini, Eucerini e outras. Cabe ressaltar que na tribo Apini estão incluídas as espécies exóticas do gênero *Apis*, introduzidas no Brasil por volta do século XIX. A subfamília Meliponinae da família Apidae (MICHENER, 2000), distribui-se por regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo e, geralmente não avança para as regiões temperadas como a *A. mellifera*. O néctar é utilizado pela maioria das espécies de abelhas como fonte de carboidratos, enquanto que o pólen e ou óleos florais, como fonte de proteínas, principalmente para as formas larvais (ROUBIK, 1989; FREE, 1993; MICHENER, 2000).

A *A. mellifera*, espécie de abelha utilizada no presente estudo, pertence à família Apidae, subfamília Apinae, tribo Apini, subtribo Apina (SILVEIRA; et al., 2002). No Brasil, abelhas *A. mellifera* foram introduzidas em 1839, quando o Reverendo Antônio Carneiro importou da Europa colmeias de *Apis mellifera mellifera* Linnaeus 1758 (abelha preta ou alemã) com o intuito de produzir mel e utilizar a cera produzida por elas para a fabricação de velas (NOGUEIRA-NETO, 1972). Posteriormente imigrantes europeus trouxeram as subespécies *A.m. ligustica* (Spinola 1806), *A.m. carnica* (Pollmann 1879) e *A.m. caucasiana* (Gorbachev 1916) entre outras (GONÇALVES, 1994). No ano de 1956, o geneticista Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, trouxe do continente africano abelhas da subespécie *A. m. scutellata* (Lepelletier 1836) com o objetivo de melhorar quantitativa e qualitativamente os produtos apícolas (KERR, 1967). As colmeias foram alocadas no Horto de Camacã, no município de Rio Claro-SP, de onde alguns enxames fugiram (KERR, 1967) iniciando-se uma rápida expansão destas abelhas pelo Brasil. As abelhas africanas realizaram diversos cruzamentos com as subespécies europeias já existentes no país, resultando em um poli híbrido, que foi chamado de abelha africanizada (GONÇALVES, 1974). Características como alta capacidade enxameatória, alta produtividade, forte comportamento defensivo e alta adaptabilidade, observadas nestes híbridos são aquelas predominantes na subespécie africana. A união destas características ajudou as abelhas africanizadas a se estabelecerem rapidamente como populações silvestres nas Regiões Neotropicais (LOBO; KRIEGER, 1992).

2.3 CASTAS E DIVISÃO DE TRABALHO NA COLMEIA

Em colônias de *A. mellifera*, onde vivem em média 100 mil indivíduos, é possível identificar claramente a divisão de castas (Figura 2), que apresentam diferenças quanto à anatomia, fisiologia e comportamento (ROBINSON et al., 1991). Encontramos divisão entre os indivíduos responsáveis pela reprodução (rainhas e zangões) e aqueles que fazem a manutenção da colônia (operárias). Operarias e rainhas constituem castas femininas com diferentes funções. As rainhas são responsáveis pela postura de ovos que, se forem fertilizados darão origem a operárias ou, se necessário, a rainhas virgens (organismos diploides), enquanto ovos não fertilizados originarão zangões (organismos haploides). Às operarias cabem as tarefas de manutenção da colônia, tais como limpeza, construção, cuidados com a cria e com a rainha, guarda e coleta de alimento. O trabalho realizado pelas operarias segue uma sequência determinada pela idade ou maturidade fisiológica do indivíduo, a qual é denominada de polietismo etário ou polifenismo, estando, contudo, sujeita às necessidades da colônia (FREE, 1980). Os zangões, machos férteis cuja única função em colmeias de *A. mellifera* é a fecundação da rainha, estão presentes em determinadas épocas favoráveis para a reprodução (WINSTON, 2003).

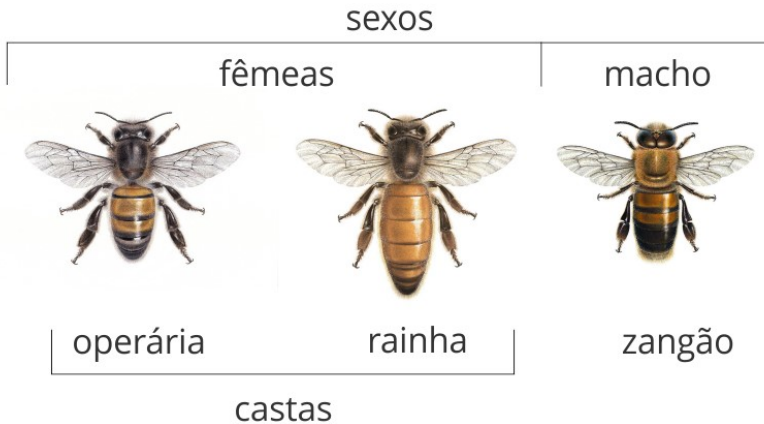


Figura 2: Esquema demonstrando a distinção entre sexos e castas em *A. mellifera*. Adaptado de Peruquetti, R.C. Introdução ao estudo sobre abelhas. Disponível em <http://www.ufac.br/ppgespa/polen>. Acesso: 21 de abril de 2017.

As abelhas são insetos holometábolos e o desenvolvimento de todos os três tipos de castas envolve uma transição por quatro fases

principais: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 3).

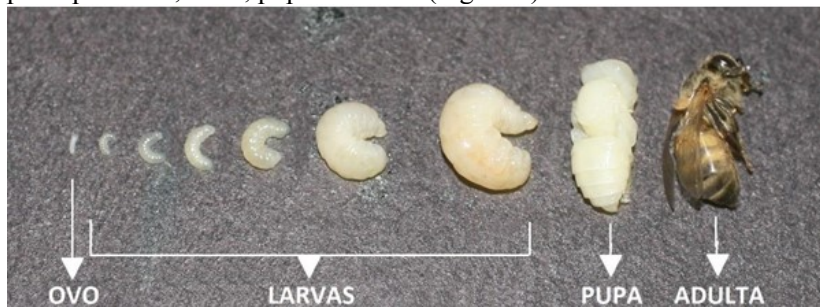


Figura 3: Diferentes fases do ciclo de vida das abelhas *A. mellifera*. Fonte: Adaptado de Cardozo, 2014.

Além das diferenças morfológicas externas, rainhas e operárias distinguem-se internamente quanto ao sistema reprodutor, onde as rainhas apresentam ovários com cerca de 150-180 ovariolos e as operárias possuem apenas 4-7 ovariolos em cada um de seus ovários e uma espermateca rudimentar. Quanto ao sistema endócrino, existem glândulas que são específicas de rainhas e outras de operárias, como por exemplo, a glândula hipofaríngea, secretora de geleia real presente somente em operárias (WINSTON, 2003).

2.4 GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS

Relacionadas com o desenvolvimento de várias tarefas na colônia, as glândulas exócrinas são muito importantes para os insetos sociais (CRUZ-LANDIM, 1992). Entre elas, destacam-se as glândulas hipofaríngeas, estruturas consideradas exclusivas dos himenópteros, sendo encontradas com diferentes graus de desenvolvimento em insetos desta ordem.

Morfológicamente apresentam-se como duas estruturas em forma de cachos longos, com um canal central onde se ligam numerosos ácinos secretores (Figura 4). Estão localizadas na cabeça das operárias, recobrendo a porção médio-anterior do cérebro (HUANG et al., 1989; COSTA; CRUZ-LANDIM, 1999). Fazem parte das glândulas anexas do sistema digestório, sendo responsáveis pela síntese de enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen. As proteínas secretadas na geleia real são, sobretudo, derivados do pólen. Scarselli et al. (2005), identificaram sete proteínas em pólen apícola que são isoformas de proteínas encontradas em geleia real (MRJP-1 e MRJP-2),

portanto, a quantidade e qualidade do pólen consumido pelas nutrízes está relacionada com o desenvolvimento de suas glândulas hipofaríngeas, que é representado pelo diâmetro de seus ácidos (PERNAL; CURRIE, 2000).

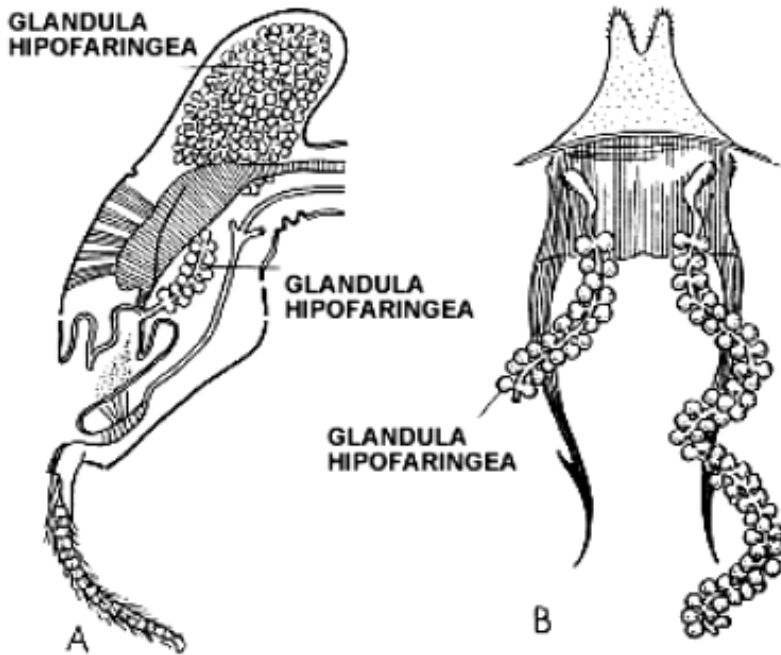


Figura 4: Morfologia da glândula hipofaríngea de *A. mellifera*. Esquema da cabeça com destaque para a glândula hipofaríngea (A e B). (Adaptado de Macedo, 2009).

Na espécie *A. mellifera*, as glândulas hipofaríngeas e mandibulares estão envolvidas na secreção da geleia real, substância de base proteica essencial para alimentação de todas as crias nos três primeiros dias de vida larval, e para a rainha durante toda a vida (DESEYN; BILLEN, 2005; FENG, et al., 2009; HUANG, et al., 2012; KAMAKURA, 2012). Em experimentos de laboratório, Crailsheim (1992) demonstrou que abelhas nutrízes forneciam geleia real não somente para larvas e rainha, mas também para todos os adultos, sendo o principal suplemente protéico da colônia. A geleia real é uma substância de base proteica, composta por um complexo conjunto de água, açúcares, proteínas, colesterol, aminoácidos, vitaminas (REMBOLD, 1964) e enzimas tais como a invertase (SIMPSON et al., 1968) e as amilases nas operárias coletoras, e α -glicosidases e glicose-oxidases nas operárias nutrízes (SIMPSON et al.,

1968; TAKENAKA et al., 1990). Em *A. mellifera*, a geleia real é essencial para alimentação de todas as crias, nos três primeiros dias de vida larval, e para a rainha durante toda a vida (DESEYN; BILLEN, 2005; FENG, et al., 2009; HUANG et al., 2012; KAMAKURA, 2012).

A função que as operárias desempenham dentro da colônia, bem como sua idade, são fatores envolvidos na ativação das glândulas hipofaríngeas. De acordo com Deseyn e Billen (2005) as abelhas na fase de nutriz com seis dias de idade, apresentam a glândula mais desenvolvida, quando comparada a abelhas com 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 dias de vida pós-emergência. Estes autores demonstraram também que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho dos ácinos, revelando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real. Moritz e Crailsheim (1987) e Crailsheim e Stolberg (1989), observaram que abelhas recém emergidas apresentavam ácinos menores ($81,7 \pm 1,3$ micrômetros de diâmetro) quando comparadas a abelhas com idade de oito dias ($149,0 \pm 2,8$ micrômetros de diâmetro), e que a atividade proteolítica era proporcional ao tamanho das glândulas. Estes autores também verificaram que a medida que as operárias passam desempenhar atividade de forrageamento, os ácinos das glândulas e a atividade proteolítica diminuem.

De acordo com Huang et al. (1989), o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas em abelhas operárias pode ser muito flexível, sendo afetado por fatores internos e externos à colônia. As diferentes atividades desempenhadas por indivíduos da mesma idade e a presença de larvas jovens são essenciais para a ativação das glândulas hipofaríngeas (SIMPSON et al., 1968; HUANG, et al., 1989; LASS; CRAILSHEIM, 1996; PERNAL; CURRIE, 2000; DESEYN; BILLEN, 2005). Substâncias ingeridas pelas abelhas também exercem influência sobre o tamanho dos ácinos das glândulas hipofaríngeas. A baixa disponibilidade de recursos alimentares e substâncias como inibidores de tripsina de soja (BABENDREIER et al., 2005; SAGILI et al., 2005) são fatores conhecidos por interferir negativamente no desenvolvimento das glândulas. A ação de inseticidas neonicotinóides e acaricidas, utilizados respectivamente em lavouras e no interior das colmeias, reduz o tamanho dos ácinos glandulares devido à morte celular nestas estruturas (ALAUX et al., 2010; SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013).

Os agrotóxicos, apontados como os principais causadores de mortes em abelhas, podem ser levados à colônia por diferentes maneiras e de modo contínuo durante a floração. Além disso, estes pesticidas

acabam sendo armazenados no interior da colmeia, estando disponível por longos períodos, tendo efeito crônico sobre as abelhas (SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010). Os efeitos que estes pesticidas exercem sobre as glândulas hipofaríngeas, alterando sua fisiologia e comprometendo a produção de geleia real, podem ter consequências negativas às colônias, comprometendo sua sobrevivência.

3. AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são constituídos de múltiplas classes e subclasses de componentes e são comumente classificados quanto ao organismo alvo (herbicidas, inseticidas, fungicidas) ou de acordo com sua classe química (organofosforados, triazina entre outras) (BHALLI et al., 2006).

Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (CARNEIRO, 2015) apresentando um consumo superior a 300 mil toneladas/ano de produtos formulados, o que representa mais de 130 mil toneladas de ingredientes ativos consumidos anualmente. Importante estímulo ao consumo advém da diminuição dos preços e da grande isenção de impostos dos agrotóxicos, fazendo com que os agricultores utilizem maior quantidade por hectare (SPADOTTO et al., 2004; PIGNATI et al., 2011).

No período entre 2000 e 2010, as vendas de agrotóxicos cresceram 190% enquanto que a área plantada teve um aumento de 30%. Esses dados demonstram a intensificação do uso destes produtos, aumentando seu consumo por hectare plantado, de acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA (BRASIL, 2011). O aumento no consumo médio de agrotóxicos em relação à área plantada, passou de 10,5 litros por hectare (l/ha) em 2002 para 12 l/ha em 2011 (PIGNATI et al., 2011). Esse número deve-se, em parte, às práticas de monocultura de cultivares transgênicos, ao desenvolvimento de resistência de plantas espontâneas, fungos e insetos e a mecanização agrícola (GUPTA, 2004, 2007; FRANCO et al., 2010).

3.1 HERBICIDA ROUNDUP®

Herbicidas são substâncias químicas fitotóxicas, utilizadas para destruição de plantas espontâneas ou para inibir o seu crescimento. Representam 45% dos agrotóxicos comercializados no Brasil (CARNEIRO, 2015), entre eles está o glifosato, considerado um dos herbicidas mais usados no mundo e utilizado na formulação do Roundup®.

O princípio ativo do glifosato é o "N-fosfonometil-glicina", pós-emergente, sistêmico e não seletivo, geralmente comercializado na forma de sal isopropilamônio e outros ingredientes conhecidos como tensoativos ou surfactantes, adicionados à formulação a fim de aumentar a eficácia do herbicida (GALLI; MONTEZUMA, 2005) cujas propriedades químicas permitem que se solubilize facilmente nos

ambientes aquáticos. A proporção de glifosato para o agente tensoativo no Roundup® varia de acordo com o país no qual o produto é comercializado (WILLIAMS et al., 2000; EL-SHENAWY, 2009).

O polioxietilenoamina (POEA) é o surfactante predominante utilizado nos produtos Roundup® em todo o mundo. Considerado 2 a 3 vezes mais tóxico do que o glifosato, ele favorece a penetração do herbicida na cutícula da planta, melhorando assim a sua efetividade. Deste modo, produtos formulados com este surfactante podem ser ainda mais tóxicos que o herbicida isolado (WILLIAMS et al., 2000; MESNAGE et al., 2012; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012). De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (BRASIL 2011), o glifosato está inserido na classificação toxicológica III - medianamente tóxico, e na classificação do potencial de periculosidade ambiental, categoria III - produto perigoso ao ambiente (BRASIL 2011), mesma classificação atribuída ao produto Roundup®.

O modo de ação do glifosato em plantas envolve a absorção, transporte e ação bioquímica na célula vegetal. De modo geral, o glifosato é absorvido pelas partes clorofiladas das plantas, como folhas e tecidos verdes (GALLI; MONTEZUMA, 2005), sendo também observada através da casca de espécies arbóreas, quando solubilizado em óleo (TURNER; LOADER, 1974) e por raízes de cultivos em solução nutritiva (HADERLIE et al., 1978; GRUYS; SIKORSKI, 1999). O herbicida penetra de modo rápido através da cutícula e sua passagem da superfície da folha para o apoplasto possivelmente ocorra por difusão, em função de um caminho aquoso ou hidrofílico (CASELEY; COUPLAND, 1985), uma vez que a molécula do glifosato é altamente polar. Diferenças na composição da cutícula podem interferir na absorção do produto, resultando em menor eficiência do mesmo quando a cutícula for mais hidrofóbica (CHACHALIS; REDDY; ELMORE, 2001). A redução no volume e aumento na concentração são fatores que também contribuem para aumentar a absorção do glifosato (STAHLMAN; PHILLIPS, 1979).

Por ser móvel no floema, o transporte do glifosato ocorre rapidamente no interior da planta, sendo translocado do local de aplicação para as regiões meristemáticas (PETERSON et al., 1978; CASELEY; COUPLAND, 1985; JENKS, 2007). A principal via de translocação é simplástica, ocorrendo também movimento apoplástico. Estudos indicam que o glifosato se desloca do mesmo modo que os fotoassimilados, indo das folhas para o restante da planta, estabelecendo-se uma relação de fonte e dreno (CASELEY; COUPLAND, 1985).

O mecanismo de ação do herbicida glifosato consiste em inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase

(EPSPs), impedindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina (JAWORSKI, 1972; DANIELE et al., 1997; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004; JENKS, 2007) que são precursores de proteínas, fenilpropanóides, fitoalexinas, lignina (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; JENKS, 2007) e ácidos nucleicos (GLASS, 1984). A morte da planta é resultado de vários eventos relacionados com a desregulação na rota do ácido chiquímico, como a diminuição de aminoácidos devido a atividade do glifosato (FRANZ et al., 2000), a perda de carbonos disponíveis para outras reações celulares na planta (FERREIRA et al., 2005), a redução na resposta de defesa da planta contra patógenos (LEVESQUE; RAHE, 1992) e o aumento da concentração em níveis tóxicos de nitrato, etileno, ácido cinâmico (FERREIRA et al., 2005).

De acordo com estudos desenvolvidos por Bohn et al., (2008), há resíduos de glifosato nos grãos de plantas que receberam pulverização deste herbicida durante o seu desenvolvimento, proporcionalmente à dosagem aplicada, detectados por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLEA). Estes autores encontraram 19 mg.kg⁻¹ de resíduo de glifosato nos grãos de plantas que receberam uma pulverização do produto (dosagem de 960 g ia ha⁻¹). Em grãos das plantas que receberam duas aplicações do herbicida (usando a mesma dosagem), a concentração residual aumentou para 36 mg.kg⁻¹. Duke et al. (2003) detectaram menores valores residuais de glifosato em grãos (2,18 e 3,08 mg.kg⁻¹), embora tenham usado dosagem superior do herbicida (1260 g ia ha⁻¹). A diferença nos valores residuais de glifosato nos dois trabalhos pode ser devido a metabolização da molécula pela planta, que é dependente do genótipo e das condições edafoclimáticas durante o cultivo (BOHM et al., 2008).

A presença de resíduos de glifosato nos grãos pode reduzir a qualidade fisiológica dos mesmos, interferindo na germinação e desenvolvimento de plântulas. De acordo com estudos de Bervald et al., (2010), que avaliaram o efeito do glifosato em sementes de soja convencional e transgênica (resistente ao herbicida), a presença do herbicida reduziu a qualidade fisiológica das sementes, provocando a diminuição da germinação, o desenvolvimento anormal do sistema radicular das plântulas e aumento da condutividade elétrica, além de reduzir a matéria seca daquelas plantas que conseguiram se desenvolver. Estes efeitos foram mais acentuados quando a dose do herbicida foi maior.

Os efeitos observados estão relacionados com o mecanismo de ação do herbicida. O bloqueio da biossíntese de aminoácidos aromáticos reduz os níveis de proteínas solúveis nos tecidos vegetais prejudicando a

germinação (BERVALD et al., 2010), tem efeito inibitório na organogênese, impedindo a diferenciação das raízes (NAGATA et al., 2000), interrompe o processo de mitose e provoca ruptura dos plastídeos, como efeito indireto e secundário (BARTELS, 1985). O aumento na condutividade elétrica indica que o glifosato produz danos à integridade do sistema de membranas celulares (MARCOS FILHO et al., 1987), acarretando a lixiviação de açúcares, aminoácidos, eletrólitos e outras substâncias solúveis em água (HEYDECKER, 1974), prejudicando a germinação e o vigor da semente. Sprankle et al. (1975), em um bioensaio para detecção de glifosato no solo, estudaram o espectro da sensibilidade ao herbicida em sete espécies vegetais: linho, milho, soja, trigo, cevada, aveia e pepino. Foi observado que, entre estas plantas, o linho foi a mais sensível, ficando o milho, a soja e o trigo no grupo intermediário, e entre as mais resistentes a cevada, a aveia e o pepino. Os autores observaram também que à medida que aumentava a concentração de glifosato havia dificuldade na emergência das folhas, e muitas vezes as folhas que conseguiam emergir apresentavam cloroses típicas, como as de deficiência de zinco (YAMADA; CASTRO, 2007). Também foi observado efeitos do herbicida na ultraestrutura de células de raiz tratadas com glifosato, com sintomas de perda de microtúbulo e núcleo fortemente lobado ou micronúcleo ou presas a certos estádios de divisão (YAMADA; CASTRO, 2007).

A utilização excessiva deste herbicida faz com que ele esteja presente no ambiente, contaminando diferentes cadeias tróficas, em maior ou menor grau. Em um estudo ambiental realizado por pesquisadores da Argentina com águas lixiviadas de lavouras de soja naquele país, foi identificado o glifosato em concentrações entre 0,10 e 0,7 mg/L (0,10 e 0,7 ppm) (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008). Em sedimentos e em solos, os valores encontrados variaram entre 0,5 e 5,0 mg/kg (0,5 e 5,0 ppm) (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008). O glifosato foi detectado em 41% das 140 amostras analisadas de água subterrânea coletadas na Catalunha, Espanha (SANCHÍS et al., 2012). Estudos ambientais de diversos locais dos Estados Unidos, Canadá e França, o glifosato e AMPA (seu derivado) foram detectados na água superficial (ANNETT et al., 2014).

A partir destas informações, é possível compreender que diferentes organismos estão expostos à ação do glifosato, devido ao seu uso excessivo e aos resíduos que se acumulam no ambiente.

3.2 EFEITOS DOS AGROTÓXICOS SOBRE ORGANISMOS NÃO ALVOS E EM ABELHAS

A comercialização e aplicação de agrotóxicos de forma intensiva e extensiva nas culturas brasileiras, tem gerado discussões quanto aos prejuízos que provocam, considerando o potencial citotóxico destes produtos sobre os organismos não alvos (GUILLÉN et al., 2012), e por esta razão, a determinação dos efeitos subletais faz-se necessário (PHAM-DELEGUE et al., 2002).

Os problemas oriundos da exposição dos organismos vivos aos agrotóxicos são inúmeros. Pesquisas têm demonstrado que a ação tóxica destes pesticidas está relacionada com alterações no sistema respiratório e hepático (KESAVACHANDRAN et al., 2006; SANTOS FILHO et al., 2003), nas funções fisiológicas, como mudanças bioquímicas que desencadeiam estresse oxidativo e danos citogenéticos (TOPE et al., 2006; JIA; MISRA, 2007). Os danos causados ao DNA pelos agrotóxicos podem desencadear processos carcinogênicos, anomalias morfológicas e alterações nos gametas, interferindo na fertilidade e sobrevivência das populações (BOLOGNESI, 2003). Dessa forma, ocorrem alterações na sobrevivência e efeitos adversos crônicos na estrutura e dinâmica de populações e comunidades (NACCI et al., 1996; KENDALL et al., 2001). A redução do tamanho populacional e a possível ocorrência da seleção de genótipos resistentes aos poluentes atuarão como efeito de gargalo genético e conseqüente perda de variabilidade (THEODORAKIS; SHUGART, 1998).

A toxicidade das preparações comerciais do Roundup® em relação ao herbicida glifosato isolado apresentam diferenças consideráveis, descritas por diferentes autores. Peixoto (2005) analisou a toxicidade mitocondrial do Roundup®, observando alterações na membrana interna destas organelas e redução de suas funções bioenergéticas, sendo que o mesmo não foi reproduzido no tratamento com glifosato isolado. Marc et al. (2002), observaram atraso no ciclo celular, o que pode ser resultado de alterações na reatividade bioenergética mitocondrial, com conseqüências drásticas na função celular através da perturbação da carga bioenergética e do equilíbrio celular. Martínez et al. (2007) testaram a citotoxicidade em células mononucleares humanas do Roundup® e do glifosato de grau analítico, e observaram que o Roundup® foi significativamente mais tóxico, reforçando a hipótese de que a toxicidade deste produto possivelmente esteja associada a interação entre seus componentes e o herbicida glifosato. Benachour e Séralini (2009) avaliaram a toxicidade de quatro herbicidas à base de glifosato em três diferentes tipos celulares.

Esses autores utilizaram a diluição correspondente aos níveis residuais do pesticida encontrados na alimentação humana ou animal, inferiores às recomendadas para o uso na agricultura e compararam as formulações comerciais com o glifosato isoladamente e com o seu principal metabolito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), assim como com o adjuvante POEA. Todas as formulações de Roundup® causaram morte celular após 24 h de exposição por meio de inibição de enzimas mitocondriais, danos de membrana, fragmentação de DNA, encolhimento nuclear (picnose) e fragmentação nuclear (cariorrexe) e indução de apoptose. Mesnage et al. (2012), demonstraram que o Roundup® e POEA são mais tóxicos do que o glifosato, por si só, em três tipos de linhagens celulares humanas. Considera-se que a presença do adjuvante POEA interfere na permeabilidade da membrana celular aumentando a toxicidade do glifosato. Estes trabalhos confirmam a toxicidade dos adjuvantes presentes nas formulações Roundup®.

O Roundup® também apresenta toxicidade sobre o sistema reprodutivo de mamíferos, atuando como um desregulador endócrino. Provoca diminuição dos níveis de testosterona na puberdade, alterações na produção de espermatozoides e outros efeitos adversos associados a reprodução e o desenvolvimento (DALLEGRAVE et al., 2007; FRANCO et al., 2010; PARRÓN et al., 2011; ROMANO et al., 2010), como a inibição da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) (WALSH et al., 2000) e da enzima aromatase (RICHARD et al., 2005), o que conseqüentemente leva à redução nos níveis de testosterona e estradiol.

A avaliação do risco dos agrotóxicos sobre determinado inseto, deve inicialmente considerar a sua biologia. Insetos sociais apresentam divisão de trabalho entre os membros da colônia, com o desenvolvimento das atividades relacionados com a idade e fatores genéticos de cada indivíduo, deve-se considerar também a sua organização social (CALDERONE; PAGE, 1992). Em geral, abelhas jovens estão envolvidas com atividades dentro da colônia (alimentação larval, limpeza e construção de células), seguido pela atividade de guarda sendo que as mais velhas realizam atividade de forrageamento (SEELEY, 1982). Contudo, o polietismo etário em abelhas não evita que outros indivíduos além das forrageiras sejam expostos aos pesticidas. Operárias que exercem atividades no interior da colônia, e os indivíduos imaturos que são alimentados com pólen e néctar estocados, também podem ser infectados. Os diferentes estágios larvais e os adultos de várias fases da vida, ou que desenvolvem diferentes, atividades podem entrar em contato

com esses produtos, que podem ser acumulados por longos períodos no interior das colmeias (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

A exposição das abelhas aos agrotóxicos normalmente ocorre por meio da ingestão de resíduos encontrados no pólen e néctar de plantas cultivadas ou das ervas daninhas (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014) que são levados pelas abelhas forrageiras e permanecem armazenados no interior das colmeias por algum tempo (ORANTES-BERMEJO et al., 2010). Também pode ocorrer pela contaminação da água que as abelhas consomem para manter sua temperatura corporal sob controle (SCHMARANZER, 2000).

Os efeitos subletais dos agrotóxicos sobre os polinizadores evidenciam, em longo prazo, comprometimento no desempenho e a viabilidade das colmeias, sendo observadas diferenças no crescimento, fecundidade, longevidade, comportamento (DESNEUX et al., 2007), índices de desempenho que incluem a taxa da massa da colmeia (FAUCON et al., 2005), na atividade forrageamento (entrada e saída pelo alvado das colmeias) (DECOURTYE et al., 2004), quantidade de cria produzida (FAUCON et al., 2005; SANDROCK et al., 2014), capacidade de aprendizagem, como encontrar o caminho de volta para a colmeia (DECOURTYE et al., 2003), a taxa de absorção de alimentos (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008; SANDROCK et al., 2014), nível de atividade locomotora (LAMBIN et al., 2001), diminuição da enxameação na primavera e dificuldade em repor a rainha (SANDROCK et al., 2014). De acordo com alguns estudos, a exposição dos polinizadores aos agrotóxicos os torna mais suscetíveis ao ataque de doenças e pragas, além de diminuir a produção de cera e mel (KRUPKE; LONG, 2015). Johnson et al. (2013) observaram que a combinação de alguns fungicidas com inseticidas mostrou-se mais mortal para as abelhas do que qualquer produto químico sozinho. De acordo com Pettis et al. (2013), a ingestão de pólen contaminado com misturas de pesticidas e fungicidas levam as abelhas a perder a resistência ao parasita *Nosema ceranae*, relacionado à CCD (HIGES et al., 2008) o que denota alterações na fisiologia e/ou imunidade dos insetos expostos à doses subletais de agrotóxicos.

Os herbicidas são considerados inofensivos para abelhas, mas há pesquisas que mostram o contrário. A utilização extensiva e prolongada destes produtos diminui a diversidade de plantas com flores (HALD, 1999; HYVÖNEN; SALONEN 2002) o que afeta diretamente as colmeias e a sua produtividade (GOULSON et al., 2015). Além disso, os herbicidas estão potencialmente biodisponíveis para as abelhas forrageiras a partir do pólen, do néctar e da água (TAPPARO et al., 2012; KRUPKE et al., 2012).

De acordo com os trabalhos de Papaefthimiou et al. (2002), 1 μM (micro mol) do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) reduziu cerca de 70% da contração inicial, a força e frequência cardíaca em *A. m. macedonica* em menos de 20 minutos após exposição ao produto, sendo essa espécie de abelhas muito mais sensível ao herbicida do que outros animais testados. Abelhas alimentadas com solução de sacarose a 60%, contaminada com dez diferentes herbicidas tiveram prejuízo considerável na produção de crias. Os testes demonstraram que Picloram, 2,3,6-TBA e dicamba, não apresentaram efeitos adversos a 1000 ppm, mas cloramben e dalapon causaram uma redução no desenvolvimento da ninhada e 2,4-D, 2,4,5-T, silvex, 2,4-DB e EPTC reduziram ou eliminaram gravemente a produção de ninhada (MORTON et al., 1972).

O glifosato é um organofosfonato que interfere na síntese da acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina (neurotransmissor central e periférico). A acetilcolina quando não é quebrada, acumula-se dentro da fenda sináptica, provocando uma grande estimulação das células-alvo, podendo afetar a locomoção e equilíbrio dos organismos expostos (GLUSCZAK et al., 2006).

Estudos específicos sobre o modo de ação do glifosato em abelhas são escassos e de modo geral demonstram que ele não interfere na sobrevivência de larvar até o sétimo dia (THOMPSON et al., 2014) e operárias adultas (HERBERT et al., 2014; HELMER et al., 2015). Outras observações foram feitas por Helmer et al. (2015), como a diminuição de β -caroteno em abelhas submetidas a alimentação contaminada com glifosato, que pode ser resultado do efeito estimulador deste herbicida sobre a atividade de enzimas ligadas a absorção, metabolização e isomeração de carotenoides. Alterações nos níveis de carotenoides em insetos conferem a perda de sensibilidade visual (DADD, 1973; PEPE; CUGNOLI, 1980; PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2009) e mudanças na coloração do tegumento (DADD, 1973). Helmer et al. (2015) também observaram pequena diminuição nos níveis de proteína em abelhas expostas ao glifosato, sugerindo alterações metabólicas devido ao efeito do herbicida. Não é conhecida a ação do glifosato na síntese de aminoácidos em animais, contudo, em vegetais ele inibe a ação de enzimas responsáveis pela biossíntese de aminoácidos aromáticos, importantes componentes das proteínas (JENKS, 2007). Jumarie et al. (2017) utilizaram o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliar a peroxidação lipídica induzida por atrazina e glifosato. Verificaram que a misturas destes herbicidas provocaram um aumento significativo níveis de TBARS, de 30 a 40% em relação aos valores do grupo controle, em doses inferiores a 1% da DL 50.

Operárias adultas de *A. mellifera* expostas a alimentação experimental contendo glifosato, tanto em doses crônicas quanto agudas, apresentaram déficits cognitivos (HERBERT et al., 2104). Foi observada redução da sensibilidade à sacarose, prejuízos na aprendizagem e dificuldades em estabelecer memórias associativas, o que poderia tornar ineficaz a coleta de recursos para a colônia, comprometendo sua sobrevivência. Estes efeitos podem estar associados ao efeito do glifosato sobre a enzima acetilcolinesterase, uma vez que em insetos a transmissão de impulsos sinápticos de natureza química ocorrem através da ação de neurotransmissores, principalmente pela acetilcolina (GALLO, 2002).

Os efeitos do glifosato em abelhas sugerem que este herbicida induz a alterações metabólicas que não causam sua morte individualmente, mas prejudicam a sobrevivência da colônia, o que é extremamente preocupante, tendo em vista que são insetos sociais. Com a intenção de simular situações reais de campo, optou-se por utilizar a formulação comercial do Roundup® em detrimento do glifosato em grau analítico. As formulações comerciais deste herbicida apresentam ingredientes inertes que podem ser ainda mais tóxicos que o glifosato isolado (WILLIAMS et al., 2000; MESNAGE et al., 2012; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012). Alguns destes ingredientes inertes (conservantes, adjuvantes ou componentes estabilizadores) também podem ter efeitos tóxicos sobre abelhas, contribuindo para a diminuição da saúde de suas populações (ZHU et al., 2014; MULLIN et al., 2016) e prejudicando seu desempenho de aprendizagem (CIARLO et al., 2012).

3.3 RESÍDUO DE AGROTÓXICOS NOS PRODUTOS DA COLMEIA

Análises realizadas em produtos apícolas como pólen, cera e principalmente mel, demonstraram grandes taxas de contaminação com produtos fitossanitários, tais como agrotóxicos, metais potencialmente tóxicos, bactérias e materiais radioativos (MULLIN et al., 2010; WIEST et al., 2011; PACÍFICO DA SILVA et al., 2015; GÉREZ et al., 2017; KARISE et al., 2017; MITCHELL et al., 2017) e até mesmo uma variedade de antibióticos, como estreptomicina e sulfonamida, que mesmo proibidos em alguns países, são utilizados para tratar infecções recorrentes em enxames (AL-WAILI et al., 2012). A ausência de um limite máximo de resíduo (LMR) para estas substâncias no mel dificulta seu controle pode representar riscos à saúde dos consumidores, além de facilitar o aparecimento de bactérias resistentes (AL-WAILI et al., 2012).

O contato contínuo das abelhas com resíduos de agrotóxicos presentes no pólen e néctar de plantas cultivadas ou espontâneas promove a contaminação do mel (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Essa contaminação também pode ocorrer a partir das substâncias presentes na água consumida pelas abelhas para manter sua temperatura corporal e do enxame sob controle (SCHMARANZER, 2000). Os resíduos presentes nestes meios podem estar abaixo da dose letal, porém persistem no mel, pólen e cera por períodos indeterminados, causando efeitos crônicos (DESNEUX et al., 2007; GOULSON, 2013; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014), e alterações na capacidade cognitiva dos indivíduos, com grande impacto em sua geolocalização, prejudicando a coleta de alimento e comprometendo a manutenção da colônia (SANCHEZ-BAYO et al., 2016).

Mullin et al. (2010) encontraram 121 diferentes pesticidas e metabólitos dentro em 887 amostras de cera, pólen e abelhas associadas a colmeias de apicultores migratórios dos Estados Unidos e Canadá. Além de encontrar altos níveis de pesticidas nas amostras de pólen e cera, seus resultados indicaram que estavam contaminados com misturas de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Estes autores também encontraram menos quantidade de resíduos em abelhas adultas e larvas. Wiest et al. (2011) avaliaram amostras de méis, abelhas e pólen coletados durante as estações de apicultura em 16 apiários do Oeste da França, localizados em quatro tipos diferentes paisagens. Eles encontraram percentagens relativamente elevadas de pesticidas utilizados para combater o varroa e fungicidas nas amostras analisadas.

Barganska; Slebioda; Namie (2013) mediram os níveis de concentração residual de 30 pesticidas em amostras de mel coletadas de apiários na região da Pomerânia (Polônia). A presença de pelo menos um dos compostos investigados foi encontrado em 29% das amostras, sendo que em 11% delas, as concentrações de agrotóxicos excediam os limites máximos de resíduos (LMR). Os resíduos encontrados tem correlação com as práticas agrícolas da região. Pacífico da Silva et al. (2015) avaliando mel de diferentes colmeias encontraram compostos residuais de 19 pesticidas em 13 em amostras de colmeias utilizadas na polinização de lavouras de melão, seis em amostras de mel de abelhas que forrageavam na floresta.

Kiljanek et al. (2016) desenvolveram e validaram um método para determinação de 200 pesticidas em seus metabólitos em amostras de abelhas. Durante os anos de 2014 e 2015, receberam e analisaram 74 amostras de abelhas de diferentes regiões da Polônia, das quais, 73 estavam contaminadas com algum tipo de pesticida. Foram identificados

57 pesticidas e seus metabólitos foram determinados (21 inseticidas e seus metabólitos, 20 fungicidas, 12 herbicidas, 2 acaricidas e 2 produtos veterinários), sendo encontrados até 13 pesticidas em uma única amostra. Mitchell et al. (2017) avaliaram a exposição global de polinizadores aos neonicotinóides (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid e thiamethoxam) a parti da análise de 198 amostras de mel de diferentes regiões do mundo. Em 75% das amostras foram encontrados pelo menos um dos cinco compostos testados, 45% continham dois ou mais deles e em 10% foram encontrados quatro ou cinco inseticidas. Embora as concentrações detectadas estejam abaixo do LMR autorizado para consumo humano, são evidentes os riscos aos polinizadores que ainda podem ser potencializados pela coexistência com outros pesticidas.

Tosi et al. (2018) realizaram uma pesquisa em 53 apiários italianos durante a temporada de apicultura ativa de 3 anos subsequentes (2012-2014). Coletaram 554 amostras de pólen corbicular de abelhas que retornavam do forrageamento. Foram detectados 18 compostos (10 fungicidas e 8 inseticidas) dos 66 analisados. Em 62% das amostras foram indentificados pelo menos um pesticida e em 1% delas foram encontrados 7 compostos. A quantidade de amostras multiresiduais foi maior do que aquelas contendo apenas um pesticida (38% e 24% respectivamente). As concentrações residuais encontradas por estes autores, excederam os limites de segurança para o consumo humano em muitas amostras.

Entre os compostos investigados nos estudos descritos acima, em nenhum momento é mencionado o herbicida Roundup® ou glifosato ou ainda o seu metabólito AMPA, mesmo ele sendo o herbicida mais utilizado em todo o mundo. Uma explicação possível para isso pode ser o fato de que rastrear a presença de glifosato ou AMPA requer uma análise separada e dispendiosa (TRAYNOR et al., 2016). Thompson et al. (2014) avaliaram néctar e pólen de flores de *Phacelia* amostradas no primeiro e quarto dia após a pulverização do herbicida e nos dois momentos a concentração de glifosato foi 10 vezes maior no pólen do que no néctar (31,3 mg e.a./kg de glifosato no néctar e 573,5mg a.e./g no pólen – 1º dia; 15,6 mg e.a./kg no néctar e 310,1 mg e.a./kg no pólen). Rubio, Guo e Kamp (2014) encontraram concentrações de glifosato acima do limite máximo permitido (LOQ 15 ppb) em cinquenta e nove por cento (59%) das sessenta e nove amostras de mel analisadas. Karise et al. (2017) determinaram a presença do glifosato em 21% das 33 amostras de mel coletadas de colmeias em apiários da Estônia. Em suas análises, verificaram também que, por duas vezes, a concentração deste herbicida esteve acima do LMR.

Estes estudos demonstram o real cenário de contaminação dos produtos apícolas. Ainda que avaliações residuais em própolis e geleia real sejam escassos, compreende-se que a quantidade crescente de xenobióticos aos quais as abelhas estão expostas não representa apenas riscos para a saúde das abelhas, mas também para os humanos.

4. NOSEMOSE

A nosemose é uma das principais doenças apícolas, com efeitos devastadores para a abelha individualmente, bem como para a colônia. Ela é provocada por um fungo microsporídio entomopatogênico pertencente ao Reino Fungi, Filo Microspora e gênero *Nosema*, que compreende cerca de 1200 espécies (KEELING; FAST, 2002) e que são encontrados em pelo menos, 12 ordens de insetos (ANDREADIS; BECNEL, 1999), dentre elas, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera e Coleoptera. São parasitas intracelulares obrigatórios, infectando células da mucosa do intestino médio de indivíduos adultos. Ovos, ninfas e larvas não são atacados (FRANZEN; MÜLLER, 1999; IRONSIDE, 2007; FOKIN et al., 2008). Em *A. mellifera*, apesar de todas as castas serem suscetíveis, as operárias são mais facilmente infectadas (PERNAL, 2012). É uma doença difícil de diagnosticar, uma vez que o agente causal não é visível a olho nu, sendo necessárias análises com uso de microscopia óptica para confirmação a presença do agente patogênico causador da doença (FRANZEN; MÜLLER, 1999).

São conhecidas duas espécies de fungos microsporídios causadores da nosemose em abelhas - *Nosema apis* e *Nosema ceranae* - ambos com distribuição mundial (KLEE et al., 2007).

Nosema ceranae é um parasita relativamente recente em comparação com a *N. apis*, que tem uma longa história de infecção das abelhas (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2011). Embora os dois microsporídios causem mortalidade, ensaios laboratoriais demonstram que *N. ceranae* é mais letal para as abelhas, produz maior carga de esporos na sua reprodução e estes são mais resistentes no meio ambiente (FRIES et al., 2010; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007; HIGES et al., 2013), mostrando-se mais virulento em relação à *N. apis*, para as mesmas cargas de esporos (PAXTON et al., 2007). Outra diferença observada entre estes microsporídios diz respeito a incidência máxima da doença em relação às estações do ano e temperaturas ambientais. Assim *N. apis*, normalmente tem maior incidência clínica no outono, baixando ou até mesmo desaparecendo no verão. Já *N. ceranae* não apresenta sazonalidade, sendo identificada em mostras em qualquer época do ano, com preferência por temperaturas mais altas (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007).

A infecção das abelhas ocorre pela ingestão de esporos maduros, possivelmente durante o forrageamento, com ingestão de pólen contaminado, mel, água ou através de trofalaxia (L'ARRIVEE, 1965; BAILEY; BALL, 1991; HIGES et al., 2009), ela também pode ocorrer durante as atividades higienização da colmeia, limpeza de favos e

remoção de abelhas mortas ou doentes (HIGES et al., 2009). Nos períodos em que as abelhas têm menos oportunidades para os voos de limpeza, como no inverno e períodos de muita chuva, são forçadas a defecar no interior da colmeia, aumentando os índices da doença, já que os esporos podem permanecer viáveis por um período maior que um ano (FRIES, 1993).

Os fungos microsporídios causadores da nosemose apresentam ótimo desenvolvimento na temperatura de 30 a 34°C, ou seja, a temperatura observada no interior das colmeias. Nas condições ambientais adequadas, completam um ciclo evolutivo em três a quatro dias (TEIXEIRA et al., 1997). A infecção inicia quando as abelhas ingerem esporos, que germinam nas células epiteliais do intestino médio em aproximadamente 30 minutos, onde ocorre a sua replicação e produção de novos esporos, causando dilatação do abdômen, convulsões e diarreia (LARSSON, 1988; ADL et al. 2005). Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, estes fungos utilizam a energia do hospedeiro para se reproduzir (FORSGREN; FRIES, 2010), sendo que o aumento no consumo de alimento energético é diretamente proporcional a contagem do número de esporos (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2011).

A nosemose causa alterações metabólicas nas abelhas, como diminuição dos níveis de proteína, devido a redução das glândulas hipofaríngeas (WANG; MOFLER, 1970), e alteração da composição da hemolinfa ao nível dos ácidos graxos (ANTÚNEZ et al., 2009). Os sintomas dessa doença não são específicos, podendo ser confundidos com outras que afetam a colônia. Apresenta-se tipicamente com falta de vigor das abelhas e colmeia sujas com excrementos diarreicos. Os danos causados no sistema digestório fazem com que o intestino médio dos indivíduos doentes se torna branco leitoso, perdendo a coloração castanha clara do intestino saudável, deixando as abelhas debilitadas, reduzindo sua vida útil. Em pouco tempo, as abelhas afetadas diminuem as atividades de voo e podem vir a morrer nas proximidades do apiário, após abandono da colônia. As rainhas infectadas são geralmente substituídas, mesmo quando a infecção é leve (CHEN et al., 2008; HIGES et al., 2008; MAYACK; NAUG, 2009; WHITAKER; SZALANSKI; KENCE, 2011).

As abelhas estão sujeitas a numerosos agentes estressores que não atuam isoladamente. Elas estão cronicamente expostas a coquetéis de agroquímicos e a novos parasitas, cuja interação está conduzindo para perdas de colônias de abelhas (GOULSON et al., 2015). Kaatz (2005) observou que as abelhas infectadas com *Nosema* sp apresentavam maior mortalidade quando alimentadas com pólen de milho transgênico; a interação da toxina e patógeno tornavam as abelhas mais sensíveis à

infecção. Alaux et al. (2010) avaliaram a interação de inseticidas neonicotinóides com agentes patogênicos e o efeito para a saúde das abelhas. Estes autores observaram que as abelhas tratadas com Imidacoprid e alimentadas com esporos de *Nosema* sp. apresentaram redução da longevidade e diminuição da glicose oxidase. Embora a infecção por esporos *Nosema* seja tipicamente detectada em abelhas forrageiras mais velhas, Wu et al. (2012) demonstraram que abelhas expostas a altos níveis residuais de pesticidas durante o desenvolvimento larval são mais suscetíveis à infecção por *N. ceranae*, exibindo infecção em idade mais jovem, quando comparadas com abelhas que não expostas a resíduos de pesticidas durante a fase larval. Estudos desenvolvidos por Pettis et al. (2013) demonstraram que pólen contaminado com misturas de pesticidas e fungicidas diminui a resistência das abelhas ao parasita *N. ceranae*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E CONDUÇÃO DOS BIOENSAIOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina e no Apiário Experimental “Cidade das Abelhas”, localizado no Bairro Saco Grande, Florianópolis – SC (27°32'12.28"S, 48°30'5.82"O) (Figura 5), onde estão as colmeias racionais de abelhas africanizadas (*A. mellifera*). As colônias de abelhas estavam acondicionadas em caixas de madeira do tipo Langstroth, com dez favos, sem melgueiras. Antes do início dos tratamentos e avaliações, foram observadas as condições fisiológicas das colônias, que foram manejadas para estarem livres de doenças, ter rainha sadia e com boa taxa de postura.



Figura 5: Apiário experimental “Cidade das Abelhas”, registrado em 15 de abril de 2016. Foto: Fanta, 2016.

5.2. PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS

5.2.1 Alimento energético: xarope de açúcar invertido

O alimento energético, também conhecido como xarope de açúcar invertido, é formado basicamente pela mistura de água e açúcar, com adição de ácido para que ocorra a hidrólise da sacarose. O ácido inverte a sacarose em glicose e frutose, pré-digerindo o xarope e facilitando que fosse sorvido pelas abelhas (PEREIRA, 2010). Este alimento energético foi preparado previamente utilizando-se açúcar cristal (5 quilogramas) e água (1,7 litros). A mistura foi levada ao fogo e, ao levantar fervura, 5g de ácido tartárico foram adicionados e a mistura mantida em fogo baixo por mais cinco minutos. Depois do fogo ser desligado, deixou-se a mistura esfriar naturalmente para ser armazenada em garrafas plásticas de 5 L.

5.2.2 Determinação da concentração do herbicida Roundup® utilizada nos bioensaios

Foi utilizado Roundup® Original (COMPOSIÇÃO: Sal de Isopropilamina de N-(fosfonometil) 480 g/L; equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO) 360 g/L; Ingredientes inertes 684 g/L) de acordo com a bula do produto. Optou-se pelo uso do produto comercial, com a intenção de simular a situação de campo, observando assim os efeitos do herbicida glifosato em sinergia com outros componentes da formulação, além do princípio ativo.

A quantidade de Roundup® utilizada nos bioensaios foi de equivalente a aproximadamente 0,35 mg. L⁻¹ e 0,7 mg. L⁻¹, respectivamente, de produto ativo de glifosato em 200mL de xarope de açúcar. Essa quantidade é proporcional ao que o fabricante recomenda para aplicação do produto no campo, está abaixo da quantidade utilizada por Herbert et al. (2014) (0 a 3,7 mg. L⁻¹) e é a mesma encontrada por Peruzzo et al, (2008) em águas lixiviadas de plantações de soja (identificaram 0,7 mg. L⁻¹ do herbicida).

5.2.3 Preparo das soluções de alimento fornecidos às colmeias

Os bioensaios foram compostos inicialmente por colmeias que receberam o alimento energético com a adição de Roundup® (solução A) e, em um segundo momento, por colmeias que receberam a solução A juntamente com pólen (solução B). Para ambas as soluções, a volume de alimento energético utilizada foi de 200 mL.

As colmeias que receberam a solução A permaneceram com livre entrada de pólen, assim como as do grupo controle. As colmeias que receberam a solução B tiveram a entrada de pólen restringida por meio da instalação de coletores de alvado (Figura 6-B e C). O pólen multifloral foi coletado diariamente, armazenado sob refrigeração e utilizado no preparo da solução B e administrado às colmeias, sendo disposto em alimentadores de superfície de acordo com Wiese (1993) (Figura 6-D e E).

O cálculo para determinar a quantidade de pólen fornecido às colmeias foi baseado em estudos de criação de larvas *in vitro*, que utiliza 2mg de pólen por larva (HENDRIKSMA; HÄRTEL; STEFFAN-DEWENTER, 2011). Com base na quantidade de larvas presentes nas colmeias que compunham o bioensaio (em média três quadros por caixa), foi determinado que era necessário 60g de pólen para suprir suas

necessidades. Em todas as colmeias, esta alimentação artificial foi fornecida por três semanas consecutivas.

As colmeias que compõe o grupo controle receberam apenas 200 mL xarope de açúcar invertido (Figura 6-A).



Figura 6: Alimentação artificial oferecida às colmeias em alimentadores de superfície. A – Colmeia do grupo controle recebendo alimento energético; B e C – Coletor de pólen de alvado e a gaveta do mesmo, contendo o pólen armazenado durante 24 horas, respectivamente; D e E – Solução fornecida às colmeias do tratamento Roundup® (em alimentador de superfície) e operárias coletando este alimento para armazená-lo no interior da colmeia. Foto: Fanta, 2017.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras foi feita diretamente em cada uma das colmeias que compõe o conjunto experimental, a partir do 25º dia após o início dos tratamentos.

As abelhas submetidas ao teste de Índice de Sobrevivência (IS) e de ativação das glândulas hipofaríngeas (GH), foram obtidas das colmeias que compõe cada um dos conjuntos de tratamentos determinados.

6. CAPÍTULO I

ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ROUNDUP® EM MEL E AS IMPLICAÇÕES PARA A SOBREVIVÊNCIA DA COLMEIA

6.1 RESUMO

Resíduos de substâncias tóxicas presentes no mel representam um problema de saúde pública, devido a suas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Sua contaminação também representa riscos para a saúde das abelhas, consideradas bioindicadores ambientais e que vêm apresentando declínio em suas populações. A dificuldade em determinar a presença de algumas substâncias em mel, faz com não sejam investigadas rotineiramente em laboratórios de controle, como ocorre com o glifosato, herbicida mais utilizado no Brasil. O objetivo deste estudo foi determinar a presença residual de glifosato (princípio ativo do Roundup) e seu metabólito (ácido aminometilfosfônico – AMPA) em amostras de mel provenientes de colmeias submetidas experimentalmente a alimentação contendo doses subletais deste herbicida, relacionando com aspectos qualitativos das colmeias em condições de campo. O bioensaio foi conduzido nos meses de outubro a novembro de 2017, na Cidade das Abelhas – Florianópolis (27°32'12.28"S, 48°30'5.82"O), composto por dois tratamentos e seis repetições, sendo três colmeias do tratamento controle e três submetidas a alimentação contendo 1,5µL (2,16 µg e.a./g-1) de Roundup adicionado em 200 mL de xarope de açúcar invertido, por três semanas. As colmeias foram monitoradas e avaliadas por cinco semanas consecutivas. Amostras de mel coletadas no interior dos favos destas colmeias foram analisadas por LC-MS/MS e, aquelas que receberam a alimentação contendo o herbicida, apresentaram $8,45 \pm 1,09 \mu\text{g/g}^{-1}$, $8,15 \pm 2,14 \mu\text{g/g}^{-1}$ e $23,90 \pm 2,95 \mu\text{g/g}^{-1}$ de glifosato no mel, uma semana após o fornecimento da última alimentação artificial. Na análise qualitativa, colmeias submetidas a alimentação contendo Roundup apresentaram redução na população de operárias e na área de cria, morte e não remoção de pupas, ausência de rainha sem a construção de realeiras. No tratamento controle, as colmeias permaneceram em boas condições, com presença de rainha e alta população de operárias durante todo o bioensaio. Os dados obtidos indicam que é possível determinar resíduos de glifosato em mel, a partir do método empregado, e que a presença do Roundup na alimentação das abelhas promove redução na população, causando prejuízos nos trabalhos da colônia e comprometendo sua sobrevivência a longo prazo.

Palavras-chave: glifosato, *Apis mellifera*, resíduo, contaminação, colônia.

6.2 INTRODUÇÃO

A presença de resíduos em produtos apícolas, especialmente o mel, incluem agrotóxicos, metais potencialmente tóxicos, bactérias e materiais radioativos (MULLIN et al., 2010; WIEST et al., 2011; PACÍFICO DA SILVA et al., 2015; GÉREZ et al., 2017; KARISE et al., 2017; MITCHELL et al., 2017). A intoxicação dos polinizadores, como as abelhas, causa graves efeitos, diminuindo as populações destes insetos, reduzindo a produção e a qualidade do mel e comprometendo a reprodução das comunidades de plantas. Além disso, pode ser considerado um problema de saúde pública, devido a sua grande importância na indústria alimentícia e farmacêutica (AL-WAILI et al., 2012; OTHMAN, 2012; GÉREZ et al., 2017).

O enorme incremento no uso de agrotóxicos e o aumento das áreas de monocultura, fazem parte das mudanças ocorridas na agricultura nas últimas décadas, que levaram a grandes problemas ambientais (CARNEIRO, 2015; NUNES, 2007). Os agrotóxicos utilizados na agricultura são carregados pelas abelhas durante o forrageamento para o interior da colônia, a partir da ingestão de resíduos presentes no pólen e néctar de plantas cultivadas ou espontâneas expostas a estes produtos, onde persistem em quantidades subletais por períodos indeterminados (DESNEUX et al., 2007; GOULSON, 2013; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Também pode ocorrer pela contaminação da água que as abelhas consomem para manter sua temperatura corporal sob controle (SCHMARANZER, 2000). As colmeias ficam expostas a diversos agrotóxicos simultaneamente (MULLIN et al., 2010; WIEST et al., 2011), que podem apresentar sinergia ou antagonismo entre si em termos de toxicidade (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014; SPURGEON et al., 2016; ZHU et al., 2017) ou com parasitas, ocasionando a morte de abelhas (GOULSON, 2015; FAITA et al., submetido).

De acordo com Claudianos et al. (2006), abelhas da espécie *A. mellifera* apresentam menor número de genes que codificam proteínas, quando comparado com outros insetos. As diferenças mais acentuadas ocorrem em três superfamílias que codificam enzimas de desintoxicação a xenobióticos, que podem representar maior sensibilidade das abelhas aos agrotóxicos (CLAUDIANOS et al., 2006), fazendo com que sejam consideradas bio-indicadores ambientais (MATIN et al., 2016). Esta característica inerente às abelhas, revela a importância de estudos sobre os efeitos dos pesticidas nestes insetos, especialmente abordando a

sinergia entre as combinações de xenobióticos, que representam interações que precisam ser considerados nas avaliações de risco (AL-WAILI et al., 2012).

É crescente o número de estudos sobre a presença de agrotóxicos em produtos das abelhas, como mel, pólen, própolis e cera (MULLIN et al., 2010; WIEST et al., 2011; PACÍFICO DA SILVA et al., 2015; GÉREZ et al., 2017; KARISE et al., 2017; MITCHELL et al., 2017) e também em abelhas que morrem sob suspeita de envenenamento (KILJANEK et al., 2016, 2017). Gérez et al. (2017) afirmam que em geral, produtos apícolas são matrizes complexas que precisam de desenvolvimento de métodos especiais para a determinação de resíduos de agrotóxicos nestas amostras, não sendo investigados rotineiramente em laboratórios de controle. O mel é uma matriz de alto teor de açúcar para a qual um número de protocolos para determinar resíduos de agrotóxicos foi relatado (GÉREZ et al., 2017). Ainda assim, alguns agrotóxicos nem sempre são identificados, devido a baixa concentração nas amostras dos produtos apícolas, gerando a falsa ideia de que não estão presentes e, por isso, não sendo associados a perda de colmeias (SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016b) ou outros efeitos adversos.

Os herbicidas a base de glifosato (HBG) são os mais comuns em todo o mundo e sua aplicação antes e durante a floração das culturas, fase atraente para abelhas, podem levar a ocorrência de resíduos no mel (KARISE et al., 2017), embora ela dificilmente apareça entre os produtos investigados. Sobre os efeitos do glifosato em abelhas, os estudos demonstram que ele não interfere na sobrevivência larval até o sétimo dia (THOMPSON et al., 2014) e de operárias adultas (HERBERT et al., 2014; HELMER et al., 2015). Porém, para operárias adultas, foi observada diminuição de β -caroteno e dos níveis de proteína (HELMER et al., 2015), redução da sensibilidade à sacarose, prejuízos na aprendizagem e dificuldades em estabelecer memórias associativas (HERBERT et al., 2014) e aumento significativo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizados para avaliar a peroxidação lipídica, em doses inferiores a DL 50 (JUMARIE et al., 2017).

Muitos estudos associam a mortalidade de abelhas com o aumento da uso de agrotóxicos. Esta evidência vem causando uma crescente preocupação da comunidade científica em compreender quais fatores e seus mecanismos estão envolvidos com a diminuição de polinizadores, relatada em diferentes partes do mundo, conhecida como desordem do colapso da colônia (DCC). Estudos desenvolvidos até o momento tem demonstrado que não existe uma causa única, mas sim, a sinergia entre parasitas, patógenos e agrotóxicos, que produzem sérios prejuízos às

colmeias (SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016b), além dos organismos geneticamente modificados (Cardozo, 2017). De maneira geral, a exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre em níveis subletais, produzindo efeitos variáveis de acordo com a exposição a um ou mais tipos de produtos comerciais, o que dificulta relacioná-los ao DCC. Devido a complexidade das colônias, é muito difícil avaliar os efeitos dos agrotóxicos para a sua sobrevivência em ensaios de campo (WEHLING *et al.*, 2009; RUNDLÖF *et al.*, 2015), ainda que a toxicidade possa ser demonstrada individualmente em laboratório (RONDEAU *et al.*, 2014). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi determinar os resíduos de glifosato e seu metabólito (ácido aminometilfosfônico –AMPA) em mel e pólen, relacionando com aspectos qualitativos das colmeias em condições de campo.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Local e condução dos bioensaios

Os testes foram realizados no Apiário Experimental Cidade das Abelhas, no Bairro Saco Grande, Florianópolis-SC (27°32'12.28"S, 48°30'5.82"O), compostos por três etapas, sendo uma delas conduzida durante os meses de setembro a novembro de 2016 e outras duas nos meses de agosto a novembro de 2017. Em cada etapa, as repetições foram monitoradas semanalmente após o início da alimentação artificial, pelo período mínimo de cinco semanas. Foram avaliados o número de indivíduos na colônia, a presença ou não da rainha a partir da identificação da postura de ovos e as condições da área de cria.

6.3.2 Herbicida utilizado

Foi utilizado Roundup® Original (composição: Sal de Isopropilamina de N-(fosfonometil) 480 g/L; equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina (Glifosato) 360 g/L; Ingredientes inertes 684 g/L) de acordo com a bula do produto. Optou-se pelo uso do produto comercial, com a intenção de simular a situação de campo, observando assim os efeitos da formulação comercial do herbicida a base de glifosato. A concentração do herbicida administrada às colmeias foi de 1,5 µL. A quantidade de glifosato utilizada nos bioensaios corresponde a 2,16 µg e.a./g⁻¹. Para todos os tratamentos, a volume de alimento energético utilizada foi de 200 mL, disposto nos alimentadores de superfície de acordo com Wiese (1993).

A primeira etapa (2016) foi composta por três tratamentos (controle, Roundup® 0,75 µL; Roundup® 1,5 µL) com três repetições.

Todas as colmeias permaneceram com livre entrada de pólen e o Roundup® foi adicionado ao xarope de açúcar fornecido às colmeias. A segunda e a terceira etapa foram compostas por dois tratamentos (controle; Roundup® 1,5 µL) e por quatro e três repetições, respectivamente. Para estas colmeias, o herbicida foi adicionado ao alimento energético (xarope de açúcar) misturados com 60 g de pólen. A entrada de pólen foi restringida por meio da instalação de coletores de alvado durante o período em que foram monitoradas. O pólen foi coletado diariamente, armazenado sob refrigeração e utilizado no preparo do alimento administrado às colmeias.

6.3.3 Coleta das amostras

A coleta das amostras de mel e pólen foi realizada apenas no mês de novembro de 2017, diretamente de cada uma das colmeias que permaneceram vivas após os bioensaios, de modo aleatório em pelo menos cinco favos. Com auxílio de uma Pipeta Pasteur Descartável, foram coletadas duas amostras de mel com 1,5 mL cada e transferidos para tubos de polipropileno com capacidade de 2 mL. Duas amostras de pólen contendo em média 2 g cada, foram coletadas utilizando-se uma microespátula de metal e o material transferido para tubos de polipropileno com capacidade de 2 mL. As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até serem encaminhadas para análises de resíduos no Laboratório de Eletroforese Capilar da Universidade Federal de Santa Catarina. A remoção dos coletores de pólen das colmeias que receberam alimento contendo Roundup® foi feita somente após as coletas de amostras.

6.4.4 Detecção do princípio ativo (Glifosato) e de seu principal metabólito (AMPA)

Na realização do presente trabalho foram utilizados padrões de glifosato, glufosinato e AMPA (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Para as soluções que compõe a fase móvel foram utilizados acetonitrila grau HPLC (Tedia, São Paulo, Brasil), a água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore, Bedford, E.U.A) com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm e carbonato de amônio (> 99% - Fluka Analytical, São Paulo, Brasil).

As soluções de glifosato e seu metabólito AMPA foram preparadas na concentração estoque aproximadamente 1000 mg L⁻¹ e a partir destas soluções foram preparadas as de concentrações de trabalho.

6.3.5 Instrumentação

Para o método proposto (Underivatized glyphosate - App ID: 22767, Phenomenex), foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) obtido da Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador *online* (G1322A), bomba quaternária (G1311A) que conduziu uma fase móvel de composição gradiente de (A) 95% acetonitrila e (B) carbonato de amônio (10 mmol L⁻¹; pH 9,2) nas seguintes proporções: 0 min. 5% de B; 1,5 min. 5% de B; 3,0 min. 85% de B; 6,5 min. 95% de B; 7,0 min. 95% de B; 7,01 min. 5% de B e 10 min. 5% de B a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna Luna NH₂ de dimensões 150 x 2 mm; 3 µm – 100 Å, obtida da Phenomenex (Torrance, Califórnia, Estados Unidos). Foi acomodada no compartimento de colunas com controle de temperatura independente (G1316A) a 25°C. Foram introduzidos no sistema 15 µl das soluções de calibração e amostras utilizando um autoamostrador (G1367B).

Ao HPLC foi acoplado o espectrômetro de massas triplo quadrupolo Q trap 3200 com fonte de ionização ESI, Turbo V *Ion Source/TurboIonSpray*, (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada).

O nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás nos processos envolvidos na fonte de ionização e fragmentação. A ionização foi conduzida no modo negativo e resolução *Unit*. O método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi utilizado para acompanhar AMPA, glifosato e glifosinato pelas transições de massas (m/z (Q1) → m/z (Q3)). Para cada analito foram utilizadas duas transições, uma de quantificação e outra de confirmação descritas na Tabela 1, assim como as energias otimizadas no processo. Além das condições operadas na fonte de ionização descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Transições de quantificação e confirmação monitoradas para o glifosato, seu metabólito AMPA e o padrão interno glifosinato, além das energias otimizadas para as suas análises por espectrometria de massas. Fonte: Fanta, 2018.

Analito	Massa Q1	Massa Q3	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
AMPA	110	63	150	-35,0	-6,5	-11,8	-24,0	0,0
AMPA	110	79	150	-35,0	-6,5	-11,8	-30,0	0,0
Glifosato	168	63	150	-30,0	-3,5	-13,7	-32,0	0,0
Glifosato	168	150	150	-30,0	-3,5	-13,7	-10,0	0,0
Glufosinato	180	63	150	-35,0	-2,5	-14,1	-62,0	0,0
Glufosinato	180	95	150	-35,0	-2,5	-14,1	-24,0	-2,0

Tabela 2: Valores para os parâmetros empregados na fonte ESI no processo de ionização do glifosato, AMPA e glufosinato. Fonte: Faita, 2018.

Parâmetro	Valor
Gás de cortina (CUR, psi)	15
Gás de colisão (CAD, psi)	Médio
Voltagem (IS, V)	-4500
Temperatura (TEM, °C)	600
Gás de dessolvataç(GS1, p (GS2, psi)	40
	40

O algoritmo automático de integração, modificação dos parâmetros instrumentais do sistema LC-MS/MS, bem como a aquisição de dados foram verificados com o auxílio do software Analyst 1.6.2. O Microsoft Excel 2010 foi utilizado para o tratamento dos dados e confecção de tabelas.

6.3.6 Preparo das amostras

A extração que foi empregada foi baseada no método implementado pelo laboratório europeu de referência em análise individual de resíduos, do inglês *European Reference Laboratory for Single Residue Method* (EURL-SRM) (ANASTASSIADES et al., 2016). Entretanto fez-se necessária adaptação para escala reduzida, que consistiu na pesagem de aproximadamente 100 mg de cada amostra de mel expostas a 500 µL de uma solução de 60% metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. Diferente do procedimento oficial optou-se pela não utilização de padrão interno. Esta solução foi agitada por 1 min e centrifugada por 5 min a 14000 rpm (13,1 rcf). Por fim, 100 µL foram transferidos para o recipiente (vial) e analisado via LC-MS/MS.

6.3.7 Curvas de Calibração

O método de calibração selecionado foi considerando o ajuste dos dados ao modelo linear. Foi realizado por adição de padrão a matriz isenta, em seis níveis de concentrações que variaram de 0,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o AMPA e de 0,64 a 6,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o glifosato. Para tal, aproximadamente 100 mg de amostra isenta foi pesada para cada nível de concentração. Cada um dos níveis de concentração de ambos os analitos estavam contidos em volume máximo de 500 μL de solução 60% metanol contendo 0,1% de ácido fórmico.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Análise de resíduo em mel e pólen

A partir do método validado, foram identificados e quantificados resíduos do glifosato em todas as amostras de mel provenientes das colmeias que receberam alimento contendo doses subletais do Roundup® (Tabela 3). Para a matriz pólen, não foi possível estabelecer um método de quantificação, portanto o resultado desta análise não é apresentado. A resultante do método otimizado LC-MS/MS visando a determinação de glifosato e AMPA em mel pode ser observado o cromatograma da Figura 7.

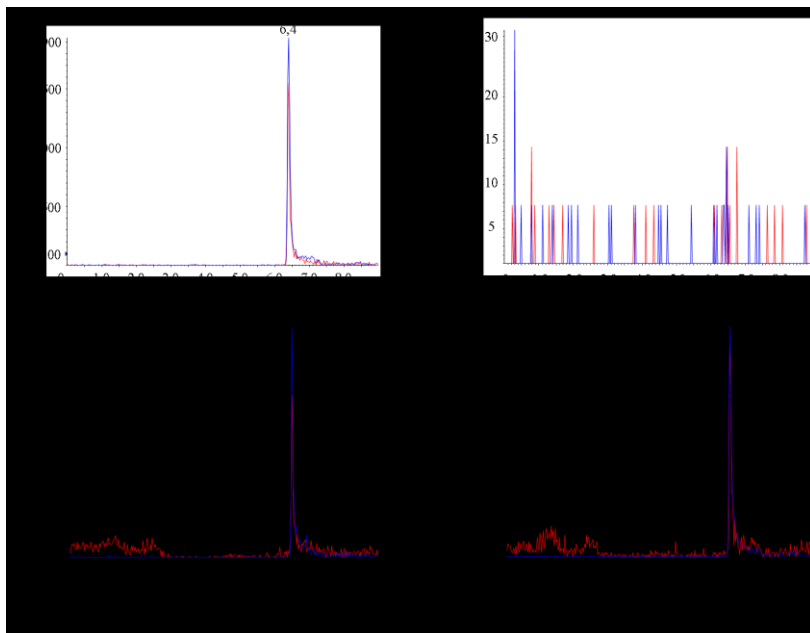


Figura 7: Cromatogramas referentes a (A) padrão de AMPA (cima) e glifosato (baixo) nas concentrações 5 e 6,4 mg mL⁻¹, respectivamente, e (B) amostra de código C8, AMPA (cima) e glifosato (baixo). A fase móvel utilizada foi de ACN: (NH₄)₂CO₃ 10 mmol L⁻¹ em uma coluna Luna NH2 (150x2,0 mm; 4µm).

Tabela 3: Concentração de Glifosato e AMPA em mel coletado de colmeias que foram expostas experimentalmente a alimentação contendo Roundup® (R1-R3) ou não (C1-C3).

Amostra	Concentração média (µg g ⁻¹)	
	Glifosato	AMPA
C1	<LOD	<LOD
C2	<LOD	<LOD
C3	<LOD	<LOD
R1	8,45 ± 1,09	<LOD
R2	23,90 ± 2,95	<LOD
R3	8,15 ± 2,14	<LOD

*número de réplicas autênticas igual a 3 ($n = 3$), $< LOD$ – inferior ao limite de detecção do método utilizado, R4 – Mel de Colmeia que fazia parte do conjunto de repetições da segunda etapa do bioensaio, onde o alimento contendo Roundup® foi administrado 60 dias antes da coleta das amostras.

A concentração média de glifosato nas amostras de mel foi maior do que aquela presente na dose de Roundup® administrada ao alimento das colmeias ($2,16 \mu\text{g e.a./g}^{-1}$). Porém, foi menor do que os resíduos médios encontrados por Thompson et al. (2014) em amostras de néctar coletados em flores de *Phacelia* no primeiro dia após a pulverização do herbicida ($31,3 \text{ mg e.a./kg}$) e também entre os dias 1 – 3 após a pulverização ($15,6 \text{ mg e.a./kg}$). É possível que a maior concentração de glifosato nas amostras de méis analisadas tenha ocorrido em virtude do processo de desidratação que este produto é submetido no interior das colmeias. Além disso, a alimentação artificial foi fornecida semanalmente e o xarope de açúcar contendo o herbicida pode ter sido estocado repetidamente nas mesmas regiões do favo. Mesmo em menor concentração ($R4 = 3,12 \pm 0,89 \mu\text{g /g}^{-1}$), o glifosato estava presente também na amostra de mel da colmeia da segunda etapa do bioensaio, que não recebia a alimentação artificial há mais de cinco semanas. Não foi identificado AMPA nas amostras, sugerindo que no mel, o glifosato não é metabolizado em um período médio de 45 dias. Karise et al. (2017) analisaram 33 amostras de mel coletados no interior de colmeias na Estônia e, em seus resultados não encontraram AMPA dentro dos limites detectáveis. Contudo, os autores encontraram glifosato em concentrações de de 5 a $62 \mu\text{g kg}^{-1}$, isto representa concentrações na ordem de partes por bilhão (ppb), enquanto que no presente estudo, as concentrações estão na ordem de partes por milhão, ou seja, representam sistemas mais concentrados.

Embora Thompson et al. (2014) afirmem que o declínio do glifosato em matrizes como mel e pólen seja rápida, não foi encontrado suporte na literatura que elucide o modo e o tempo de degradação deste herbicida em produtos apícolas, sendo possível que ele permaneça disponível por longos períodos no interior da colmeia. Os HBG representam os agrotóxicos mais comercializados no Brasil (CARNEIRO, 2015) e outros países como a Estônia e o Norte da Europa, para aplicação tanto em lavouras como para o controle de plantas espontâneas em outros ambiente (KARISE et al., 2017). Entretanto, praticamente não há estudos sobre resíduos e longevidade deste agrotóxico em produtos apícolas, como o mel, possivelmente pelo fato de

que rastrear a presença de glifosato AMPA requer uma análise separada e dispendiosa (TRAYNOR et al., 2016). Além disso, não há monitoramento para glifosato em matrizes de plantas relevantes para abelhas, pois o foco para esse tipo de avaliação geralmente é mais voltado para inseticidas, do que herbicidas (THOMPSON et al., 2014). Adicionalmente, Liao et al., (2017) demonstraram que as abelhas apresentaram preferência em concentrações específicas de o glifosato e o clorotalonil presentes em dietas artificiais açucaradas, quando comparados com outros agrotóxicos, sugerindo que a quantidade destes produtos em mel seja elevada.

Mesmo que os herbicidas não sejam indicados para matar insetos, o seu uso em larga escala em sistemas agrícolas e também na manutenção da vegetação em estradas, cidades e jardins particulares, configuram várias rotas para que o glifosato esteja presente no néctar e pólen coletado por abelhas (KARISE et al., 2017). Thompson et al. (2014) observaram que, os níveis residuais de glifosato no pólen são aproximadamente 10 vezes maiores do que em néctar. Karise et al. (2017) determinaram resíduos de ingredientes ativos pertencentes as três classes básicas de agrotóxicos em amostras de mel, dos quais a maior parte foi de herbicidas, dentre eles o glifosato, que esteve presente em 21% das 33 amostras analisadas e duas vezes acima do limite máximo de residual. Estes autores ainda discutem que as baixas concentrações encontradas em seu estudo, não representam risco para a saúde humana e estão abaixo das doses agudas letais, contudo, os riscos da contaminação crônica para as abelhas não deve ser descartado.

6.4.2 Análise qualitativa nas colmeias

Não foi observada redução na população de abelhas nas colmeias das repetições da primeira etapa dos bioensaios (2016), quando comparados os três tratamentos. Entretanto, na segunda e terceira etapa (2017), as repetições que receberam alimentação contendo Roundup® tiveram redução na população de indivíduos na colmeia, quando comparadas às repetições do tratamento controle.

Na segunda etapa, essa redução ocorreu a partir da terceira semana da dos bioensaios e, além da diminuição na população de operárias adultas, também houve redução na área de cria e irregularidade na idade de larvas e pupas (Figura 9 – B) quando comparados ao tratamento controle (Figura 9 – A). É possível que estas crias não estivessem completando seu ciclo de desenvolvimento, sendo removidas e a rainha estivesse fazendo nova postura, justificando essa diferença de idade. Foi

observado também, uma mortalidade de 10 a 15% das pupas já em fase final de desenvolvimento (Figura 9 – C e D), que não eram removidas do interior dos favos devido a redução do comportamento higiênico nas colmeias expostas experimentalmente ao HBG (Cardozo, 2017). Nas semanas seguintes, como a alimentação deste tratamento foi mantida, ocorreu diminuição no número de indivíduos adultos, comprometendo a realização dos trabalhos na colmeia. Na quinta semana do bioensaio, todas as colmeias deste tratamento apresentaram reduções severas em suas populações e, uma semana após ser removido o coletor de pólen e suspensa a alimentação contendo o herbicida, uma das quatro conseguiu se recuperar. A análise do mel desta colmeia revelou resíduos de glifosado ($3,12 \pm 0,89 \mu\text{g g}^{-1}$). As outras três colmeias apresentavam cerca de 100 operárias no interior da caixa, com crias mortas e sem rainha. Em condições normais, uma colmeia apresenta uma população média de 60 a 80 mil indivíduos. Em contrapartida, as colmeias do tratamento controle não apresentaram alterações em suas populações.

Conforme já mencionado, os níveis de residuais de glifosato são aproximadamente 10 vezes maiores no pólen do que no néctar e, este alimento que constitui a base proteica da colmeia, é fornecido às larvas e também consumido pelas operárias nutrizas para a produção de geleia real (HUANG et al., 1989 COSTA; CRUZ-LANDIM, 1999). Embora tenha sido relatado que o glifosato não afete negativamente a sobrevivência de operárias em fase larval ou adultas (THOMPSON et al., 2014; HERBERT et al., 2014), estes autores não fizeram estudos de monitoramento de colônias em campo, apenas testes pontuais em laboratório, que não representam a magnitude dos efeitos deletéricos que este herbicida pode ter sobre as abelhas a médio e longo prazo. Deste modo, é possível que os resíduos do Roundup® presente no alimento das abelhas, principalmente no pólen, tenham interferido no ciclo de desenvolvimento de larvas e pupas, causando mortalidade pela intoxicação ou deficiência nutricional e comprometendo a sobrevivência da colônia.

Nas colmeias correspondentes às repetições do tratamento controle, não foi constatado ausência da rainha e nenhuma das etapas do bioensaio. Contudo, em colmeias receberam alimento contendo Roundup®, além da redução na população, foi constatado a ausência da rainha durante a primeira e segunda etapa dos bioensaios. Na primeira etapa, a ausência da rainha foi verificada em duas colmeias na quarta semana após o início das avaliações, e como as operárias não construíram realeiras, foram realizadas duas tentativas de introdução de rainha e uma de realeira, as quais foram rejeitadas pela colônia. Logo após estas tentativas, foi verificado alta taxa de postura pelas operárias (Figura 9 F).

A ausência de rainha e a não construção de realeiras também foi observada em três das quatro repetições da segunda etapa, que receberam pólen com Roundup®. Estas observações sugerem alterações fisiológicas das abelhas expostas experimentalmente ao Roundup®, implicando em possível desregulação hormonal e mudanças comportamentais que interferem no padrão comportamental destes insetos sociais, provocando morte da colmeia a longo prazo.

Estudos realizados em colmeias expostas cronicamente a inseticidas neonicotinóides a longo prazo, apresentaram perda da rainha 1,5 meses após o início dos tratamentos em 60% das colônias avaliadas, diminuição da população de abelhas adultas e larvas, não substituição de rainhas e a não enxameação no início da primavera, além da diminuição da imunidade social, em comparação com colmeias não expostas a contaminação experimental pelos inseticidas (DALLEGRAVE et al., 2007; FRANCO et al., 2010; PARRÓN et al., 2011; ROMANO et al., 2010; TSVETKOV et al., 2017; WOODCOCK et al., 2017). Os efeitos de resíduos de agrotóxicos em colmeias podem ser ainda piores quando há presença de diferentes contaminantes, que exercem efeito sinérgicos, e ainda a interação com fatores ambientais que podem amplificar o impacto das perdas de abelhas (WOODCOCK et al., 2017; ZHU, Y. C. et al., 2017).

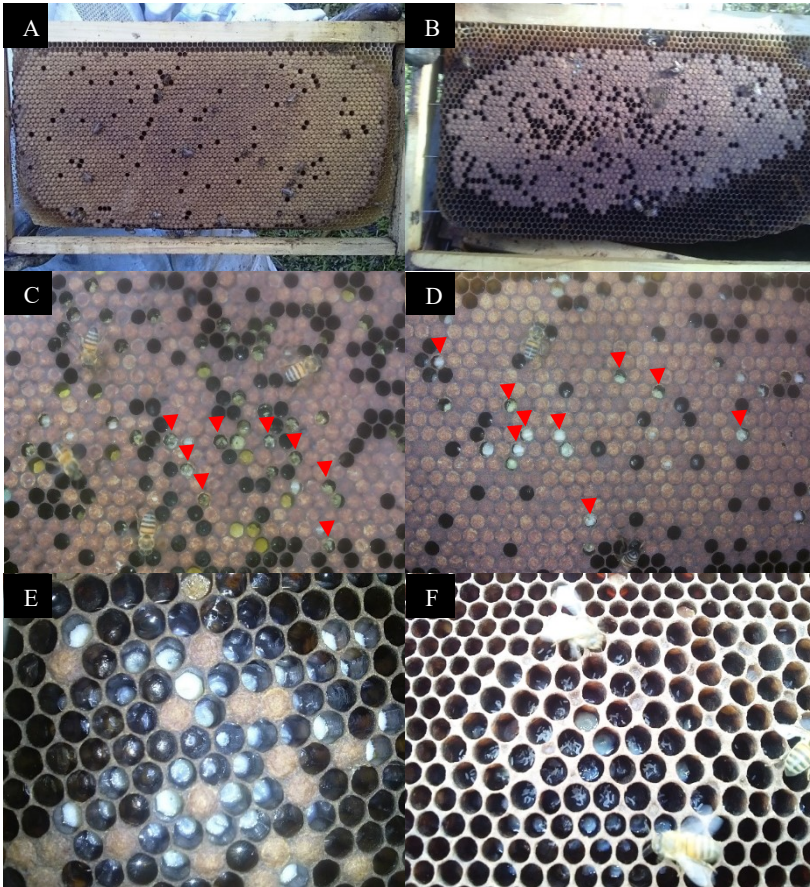


Figura 8 - Imagens registradas de favos de colmeias dos tratamentos controle (A) e que receberam Roundup® misturado ao pólen (B-E), registradas após três semanas do início dos bioensaios em 2017. A – área de cria tratamento controle; B – área de cria tratamento Roundup®; C e D – setas vermelhas indicando algumas das pupas mortas e não removidas pelas operárias; E – crias com diferentes idades de desenvolvimentos; F - Ovos de operárias de *A. mellifera* em colmeia órfã, observada 24 horas após tentativa frustrada de introdução de rainha em colmeia tratada com Roundup® no ano de 2016. Fonte: Fanta, 2016 e 2017.

Em mamíferos, o Roundup® atua como desregulador endócrino, com vários efeitos adversos associados a reprodução e o desenvolvimento (WALSH et al., 2000), como a inibição da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) e da enzima aromatase (RICHARD et al., 2005).

No entanto, pouco é conhecido sobre o modo de ação deste herbicida no organismo de invertebrados, especialmente nas abelhas sociais, que tem toda sua organização de castas e divisão de trabalho baseada na comunicação química através de feromônios. Qualquer alteração nesse delicado equilíbrio pode comprometer a sobrevivência da colônia.

6.5 CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas foi possível determinar a presença do glifosato nas amostras de mel e verificar que, em um período médio de 45 dias, não ocorreu sua metabolização, convertendo-o em AMPA.

Adicionalmente, as avaliações qualitativas das colmeias demonstraram que a presença de doses subletais de Roundup® na alimentação das abelhas não afetam a sobrevivência de indivíduos adultos, mas exerce efeitos deletérios severos sobre a colônia, principalmente quando presente no pólen. De acordo com as observações realizadas, é provável que os danos às colônias ocorreram pela sinergia de muitos fatores, sendo possível inferir que a intoxicação pelo herbicida tenha causado: 1 - desorientação das abelhas forrageiras que deixaram de executar a coleta de alimentos para a colônia; 2 - redução na imunidade e aumento na suscetibilidade à patógenos; 3 - morte da cria e consequente diminuição da população de indivíduos adultos; 4 - carência nutricional e possível alteração na constituição da geleia real; 5 – morte e não reposição da rainha; 6 - alterações fisiológicas, com possível desregulação hormonal e mudanças comportamentais, seguido de desestruturação da organização social da colmeia; 7 – mudanças na microbiota que proporciona a fermentação do pólen no interior da colmeia, tornando os nutrientes indisponíveis para as abelhas. Esta soma de fatores é compatível com o que é descrito para o evento denominado “desordem do colapso das colônias”, motivo de muita preocupação devido à grande quantidade de colmeias que estão desaparecendo em vários países, sem uma causa conhecida.

7. CAPÍTULO 2

ÍNDICE DE SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS ADULTAS DE *A. mellifera* EXPOSTAS A ALIMENTAÇÃO CONTAMINADA COM ROUNDUP® E INFECTADAS POR ESPOROS DE *Nosema* sp.

7.1 RESUMO

A redução de polinizadores pode comprometer o serviço de polinização e levar a extinção de espécies vegetais, com conseqüente declínio da fauna e comprometimento da estabilidade dos ecossistemas naturais e agrícolas. Abelhas da espécie *A. mellifera* são consideradas as principais polinizadoras de muitas plantas nativas e cultivadas, ficando em contato com agrotóxicos usados nestes ambientes, que são carregados à colônia e diminuem a sua resistência a parasitas. Com o objetivo de avaliar a interação da alimentação contendo Roundup® e a infecção por *Nosema* sp. sobre a mortalidade e o consumo de alimento de operárias adultas de *A. mellifera*, foram conduzidos bioensaios em laboratório, compostos por quatro tratamentos e monitorados por 120 h. Observou-se que esta interação contribui significativamente para a redução da sobrevivência de operárias adultas de *A. mellifera* e no aumento do consumo de alimento. Em condições naturais, estas abelhas ainda estão expostas a outros agentes estressores, além de variações nas condições ambientais, fatores que podem comprometer a sobrevivência dos indivíduos e a manutenção da colônia.

Palavras-chave: nosemose/herbicidas/mortalidade/abelhas/interação

7.2 INTRODUÇÃO

A densidade populacional de muitos polinizadores está sendo reduzida a níveis que podem comprometer os serviços de polinização nos ecossistemas naturais e agrícolas e, conseqüentemente, a manutenção da capacidade reprodutiva de plantas silvestres (KREMEN 2004). De acordo com Gulan e Cranston (2007), Mouga et al (2012) e Toledo et al (2013) a *A. mellifera* é considerada em todo mundo a principal abelha polinizadora, cujos serviços são de extrema importância para muitas espécies de plantas cultivadas, resultando no aumento de produtividade e qualidade das culturas. A contribuição econômica dos polinizadores totaliza quase 30% (aproximadamente US\$12 bilhões) do valor total da produção agrícola anual das culturas dependentes (totalizando quase US\$45 bilhões) (GIANNINI et al., 2015). Em ecossistemas naturais, as evidências da polinização insuficiente são mais sutis do que em sistemas

agrícolas, mas as consequências podem ser tão severas como a extinção de uma espécie vegetal, ou um declínio visível de animais que se alimentam de frutos e sementes, regeneração insuficiente da flora, erosão do solo e redução do volume de água (EARDLEY et al., 2006).

As mudanças ocorridas na produção agrícola nas últimas décadas, caracterizadas por grandes áreas de monocultura, elevada quantidade e diversidade de insumos e aumento do desmatamento, levaram a problemas ambientais pelo uso abusivo de pesticidas, para combater pragas, doenças e plantas invasoras (NUNES, 2007). Essas práticas têm impactando as populações de inúmeras espécies de polinizadores em escala global, sobretudo, as abelhas, consideradas como polinizadores mais efetivos, acarretando em grandes prejuízos econômicos e ambientais (FREITAS et al. 2009; CUNHA et al. 2014). Muitos destes pesticidas não são seletivos, como é o caso dos neonicotinóides, associados com a redução das populações de polinizadores em diferentes países (HENRY et al., 2012; WHITEHORN et al., 2012; DI PRISCO et al., 2013; GODFRAY et al., 2014; TSVETKOV et al., 2017; WOODCOCK et al., 2017) chegando a ser proibido pela União Europeia em 2013 (CARNEIRO, 2015).

Devido as suas atividades de forragemanto, as abelhas estão sujeitas a numerosos agentes estressores, ficando em contato com diferentes produtos utilizados na agricultura (DESNEUX et al., 2007), carregando-os para o interior da colônia onde podem persistir resíduos subletais por períodos indeterminados (GOULSON, 2013). Elas estão cronicamente expostas a coquetéis de agroquímicos e a novos parasitas, cuja interação está conduzindo para perdas de colônias de abelhas (GOULSON, 2015). Kaatz (2005) observou que as abelhas infectadas com *Nosema* sp apresentavam maior mortalidade quando alimentadas com pólen de milho transgênico; a interação da toxina e patógeno tornavam as abelhas mais sensíveis à infecção. Alaux et al., (2010) avaliaram a interação de inseticidas neonicotinóides com agentes patogênicos e o efeito para a saúde das abelhas. Estes autores observaram que as abelhas tratadas com Imidacoprid e alimentadas com esporos de *Nosema* sp apresentaram redução da longevidade e diminuição da glicose oxidase. Embora a infecção por esporos *Nosema* seja tipicamente detectada em abelhas forrageiras mais velhas, Wu et al. (2012) demonstraram que abelhas expostas a altos níveis residuais de inseticidas e fungicidas durante o desenvolvimento larval são mais suscetíveis à infecção por *N. ceranae*, exibindo infecção em idade mais jovem, quando comparadas com abelhas que não são expostas a resíduos de pesticidas durante a fase larval. Estudos desenvolvidos por Pettis et al. (2013)

demonstraram que pólen contaminado com misturas de inseticidas e fungicidas diminui a resistência das abelhas ao parasita *N. ceranae*.

Trabalhos em que foram avaliados os efeitos dos neonicotinóides a longo prazo e sob condições realistas, indicaram que estes inseticidas tiveram efeito negativo sobre colmeias monitoradas por 12 meses após a exposição, apresentando prejuízo na imunidade social (TSVETKOV et al., 2017), fisiologia reprodutiva e mortalidade da rainha (WILLIAMS et al., 2015; TSVETKOV et al., 2017). Foram observados também efeitos negativos da interação dos neonicotinóides com fatores ambientais sobre o potencial reprodutivo interanual de diferentes espécies de abelhas, com variações significativas entre os locais avaliados, sugerindo que essa interação amplifica o impacto das perdas de abelhas a longo prazo (HENRY et al., 2012, 2015; WOODCOCK et al., 2017).

Os mecanismos de ação dos herbicidas em abelhas são pouco conhecidos. Estudos de laboratório sugerem que o herbicida Paraquat induz o estresse oxidativo em operárias adultas, diminuindo os níveis de vitelogenina e a longevidade das mesmas (CORONA et al., 2007). Especificamente sobre o modo de ação do glifosato em abelhas, estudos demonstram que ele não interfere na sobrevivência larval até o sétimo dia (THOMPSON et al., 2014) e de operárias adultas (HERBERT et al., 2014; HELMER et al., 2015). No entanto, outras observações foram feitas por Helmer et al., (2015), como a diminuição de β -caroteno em abelhas submetidas a alimentação contaminada com glifosato, que pode ser resultado do efeito estimulador deste herbicida sobre a atividade de enzimas ligadas a absorção, metabolização e isomerização de carotenoides. Alterações nos níveis de carotenoides em insetos conferem a perda de sensibilidade visual (DADD, 1973; PEPE; CUGNOLI, 1980; PARRA et al., 2009). Helmer et al., (2015) também observaram pequena diminuição nos níveis de proteína em abelhas expostas ao glifosato, sugerindo alterações metabólicas devido ao efeito do herbicida. De acordo com Herbert et al., (2014) operárias adultas de *A. mellifera* expostas a alimentação experimental contaminada com glifosato apresentaram redução da sensibilidade à sacarose, prejuízos na aprendizagem e dificuldades em estabelecer memórias associativas, o que poderia tornar ineficaz a coleta de recursos para a colônia, comprometendo sua sobrevivência. Estes efeitos podem estar associados ao efeito do glifosato sobre a enzima acetilcolinesterase, uma vez que em insetos a transmissão de impulsos sinápticas de natureza química ocorrem através da ação de neurotransmissores, principalmente pela acetilcolina (GALLO, 2002).

Herbicidas não são destinados para matar insetos, por isso não possuem indicações de restrição à exposição de abelhas (JOHNSON, R. M., 2015), deixando-as em contato com elevadas concentrações quando aplicados em culturas atraentes aos polinizadores no período de floração (PETTIS et al., 2013). Estudos mais criteriosos e aprofundados nessa área podem contribuir para o entendimento de eventos que comprometem a viabilidade da colmeia, como a “Desordem do Colapso da Colônia (DCC)”, embora esse fenômeno não tenha uma única causa de ocorrência.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade de operárias adultas de *A. mellifera*, infectadas ou não com esporos de *Nosema*, expostas a alimentação contaminada por Roundup® em dose de campo recomendada pelo fabricante, no período de 120h de observação em condições de laboratório.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios para determinar o índice de sobrevivência (IS) das abelhas operárias adultas de *A. mellifera*, foram baseados nas metodologias da OECD-213 e EPPO (OECD, 1998; OEPP/EPPO, 2003), desenvolvidos no Apiário Experimental Complexo Cidade das Abelhas da Universidade Federal de Santa Catarina (27°32'12.28"S, 48°30'5.82"O) no período entre outubro e dezembro de 2016. Foram compostos por quatro repetições, arrançadas ao acaso, divididos em quatro tratamentos, cada uma com 12 abelhas de três colmeias diferentes, totalizando 36 abelhas em cada um dos quatro tratamentos. Os tratamentos foram constituídos de um grupo controle (T1) que recebeu apenas alimento energético (mel diluído em água destilada, na proporção de 1:1); um grupo que recebeu alimento energético misturado com Roundup® (T2); outro grupo recebeu alimento energético ao qual foi adicionado esporos de *Nosema* sp. (T3); e um último grupo que recebeu alimento energético misturado com Roundup® e esporos de *Nosema* sp. (T4).

O Roundup® foi misturado ao alimento energético, na concentração de 1,5 µl da formulação comercial do herbicida para 200 mL de alimento. A contaminação das abelhas por *Nosema* sp. foi feita a partir da mistura de solução contendo esporos do microsporídio ao alimento fornecido. Esta solução contendo esporos foi obtida a partir da maceração em água destilada do intestino (porção posterior e reto) de abelhas operárias adultas infectadas pelo fungo. A contagem do número de esporos por mililitro cúbico foi feita em Câmara de Neubauer, utilizando-se a concentração de aproximadamente 23.000.000 esporos em cada repetição deste tratamento.

As abelhas foram mantidas em B.O.D., na ausência de fotoperíodo e com temperatura de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e $70\% \pm 5$ de U.R., acondicionadas em potes plásticos com volume de um litro cada, perfurados para circulação de ar e receberam água e alimento administrados *ad libidum* em microtubos de 1,5 mL furados na base. Os bioensaios foram conduzidos e monitorados a cada 24 h, até o experimento completar 120 h e consistiram da contagem do número de abelhas sobreviventes. A cada intervalo de 24 h, eram contadas e removidas as abelhas mortas, efetuada a troca dos microtubos de alimento e registrada a quantidade consumida no período, totalizando cinco tempos de observação. Ao final do experimento as abelhas foram avaliadas para identificação de esporos de *Nosema* sp., de acordo com o tratamento que foram submetidas, indicando apenas presença ou ausência de esporos do microsporídeo.

Para melhor compreender os efeitos da exposição das operárias adultas de *A. mellifera* ao Roundup®, foram realizados dois bioensaios. No primeiro (IS 1), foram utilizadas abelhas provenientes de colmeias livres da presença de Roundup®, sendo expostas ao herbicida somente após e emergência. No segundo (IS 2), foram utilizadas abelhas de colmeias que receberam alimento contendo Roundup® (solução A), 40 dias antes do início dos testes.

Os dados de cada bioensaio (IS 1 e IS 2) foram submetidos às análises de variância, utilizando o delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 5 (tipos de alimentos X tempos) no programa ASSISTAT®. Em ambas as análises, as variáveis que apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, ao nível de significância de 5% de probabilidade ($\alpha = 0,05$) pelo teste F, foram submetidas ao teste de Tukey ao mesmo nível de significância. Adicionalmente, foi feito o monitoramento das colmeias do apiário utilizadas no estudo, como a existência ou não de irregularidade na idade de desenvolvimento larval nos quadros ou a mortalidade de abelhas.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 Índice de sobrevivência

A Análise da Variância revelou que não houve diferenças significativas no Índices de sobrevivência entre as repetições nas três colmeias (dados não mostrados). No entanto, a Análise da Variância indicou diferenças significativas para os valores do índice de sobrevivência a partir de 96 horas após o início dos bioensaios, em função dos tratamentos administrados. Estes resultados foram similares para

ambos os bioensaios e os dados obtidos foram analisados e são apresentados (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 4: Sobrevivência (IS-1) médio de operárias adultas em BOD, submetidas aos tratamentos alimento controle (T1), com adição de Roundup® (T2), Nosema sp. (T3) e Roundup® e Nosema sp. (T4), drante o período de 120 horas.

Tratamento	Tempo									
	24h		48h		72h		96h		120h	
T1	33,75	a A	32,75	a A	32,75	ab A	31,25	ab A	30,50	a A
T2	35,25	a A	35,00	a A	34,75	a A	34,00	ab A	32,50	a A
T3	35,00	a A	32,75	a AB	32,50	ab AB	32,00	ab AB	27,00	a B
T4	34,50	a A	31,75	a AB	27,75	b B	27,00	b B	20,25	b C
CV%	9,42									

O tratamentos, tipos de alimento e o tempo, foram estatisticamente significativos a 1% de probabilidade ($p < 0,01$). A interação tratamento e tempo foi significativo a 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Coeficiente de variação – CV.

Tabela 5: Índice de sobrevivência (IS-2) médio de operárias adultas em BOD, submetidas aos tratamentos alimento controle (T1), com adição de Roundup® (T2), Nosema sp. (T3) e Roundup® e Nosema sp. (T4), drante o período de 120 horas.

Tratamento	Tempo									
	24h		48h		72h		96h		120h	
T1	36,00	a A	34,50	a A	34,50	a A	33,75	a A	33,00	a A
T2	36,00	a A	34,25	a A	33,50	a A	33,25	ab A	33,25	a A
T3	36,00	a A	34,50	a AB	34,50	a AB	33,75	a AB	31,00	a B
T4	36,00	a A	33,50	a AB	32,75	a AB	30,00	b B	25,50	b C
CV%	5,48									

Os tratamentos, tipos de alimento e o tempo, bem como a interação tipo de alimento, x tempo foram estatisticamente significativos a 1% de probabilidade ($p < 0,01$). As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Coeficiente de variação – CV.

Para os dois bioensaios (IS-1 e IS-2) o índice de sobrevivência acumulado diminuiu com o tempo nos tratamentos que continham somente *Nosema* sp. (T3) e Roundup® e *Nosema* sp. (T4), permanecendo maior no grupo controle (T1) e naquele que recebeu apenas Roundup® (T2). Assim, foi observado efeito significativo nos tratamentos onde as abelhas receberam esporos de *Nosema* sp. (T3 e T4), que exibiram menores índices de sobrevivência, especialmente a partir das 96 horas de observação, quando comparamos aos grupos controle (T1) e Roundup® (T2).

Além disso, o grupo submetido a alimentação com Roundup® e o microsporídeo de *Nosema* sp. (T4), diferiu significativamente de todos os outros tratamentos, indicando que esta interação tem efeito aditivo na mortalidade das abelhas, sugerindo diminuição da resistência ao ataque do microsporídeo.

A nosemose causa alterações metabólicas nas abelhas, tais como a diminuição dos níveis de proteína, devido a redução das glândulas hipofaríngeas (WANG; MOFLER, 1970), e alteração na composição da hemolinfa ao nível dos ácidos graxos (ANTÚNEZ et al., 2009), deixando as abelhas debilitadas, reduzindo sua vida útil. Além disso, a interação deste patógeno com diferentes agentes estressores aos quais as abelhas estão expostas, como os agroquímicos, contribui para o aumento na mortalidade dos indivíduos e perdas de colônias de abelhas (GOULSON, et al., 2015). Outros estudos demonstraram que abelhas expostas a níveis residuais de pesticidas durante a fase larval (WU et al., 2012) e alimentadas com pólen contaminado por misturas de pesticidas e fungicidas (PETTIS et al., 2013) são menos resistentes à infecção por *Nosema* sp. A literatura também traz informações sobre o aumento da mortalidade de abelhas infectadas por *Nosema* sp. observado quando estas foram alimentadas com com pólen de milho transgênico (KAATZ, 2005) e também quando receberam alimento contaminado com diferentes concentrações de inseticidas neonicotinóides (ALAUX et al., 2010).

Além disso, são conhecidas as alterações que o herbicida Roundup® provoca nas cristas mitocondriais em células hepáticas de mamíferos, reduzindo as funções bioenergéticas destas organelas (PEIXOTO et al., 2005). As alterações observadas na cadeia transportadora de elétrons, especificamente nos complexos III e IV (GOMES; JUNEAU, 2016), promovem o aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzem a peroxidação lipídica, resultando na ruptura de membranas, alterando a integridade ou funções celulares (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993). Em células humanas o

glifosato ainda causa alterações na concentração da cisteína, um aminoácido precursor para a síntese de glutathiona (HULTBERG, 2007), um importante antioxidante celular que atua na eliminação de EROs (BARREIROS et al., 2006).

O aumento de espécies reativas de oxigênio também pode interferir na fisiologia do corpo gorduroso das abelhas, comprometendo a longevidade destes insetos (CORONA et al., 2007; AMENT et al., 2011). A função do corpo gorduroso nos insetos está relacionada com a produção de proteínas, lipídios e carboidratos para a hemolinfa, que servem como precursores para o metabolismo de diversas substâncias (ARRESE; SOULAGES, 2010) e está envolvido nos processos de desintoxicação (ROMA et al., 2006). Entre as substâncias produzidas está a vitelogenina, que em *A. mellifera* foi caracterizada como uma proteína multifuncional envolvida em vários processos biológicos como reprodução, longevidade e imunidade (AMDAM et al., 2004, 2006). De acordo com Corona et al., (2007), o herbicida Paraquat induz o estresse oxidativo em *A. mellifera*, diminuindo os níveis de vitelogenina e a longevidade das mesmas. Deste modo, considera-se que efeito semelhante pode ocorrer em abelhas expostas ao herbicida Roundup®, embora esta quantificação proteica não fizesse parte dos objetivos do presente estudo.

Para melhor visualizar os efeitos dos tratamentos ao longo do tempo de observação realizada no presente estudo, a frequência de dados para os dois testes foram dispostos nas Figuras 9 e 10.

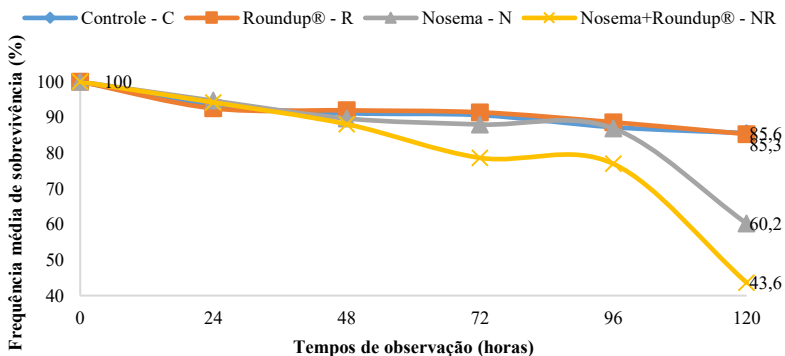


Figura 9: Dados da frequência média da sobrevivência de *A. mellifera* expostas a alimentação com ou sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp., após a emergência, submetidas a diferentes tratamentos em BOD.

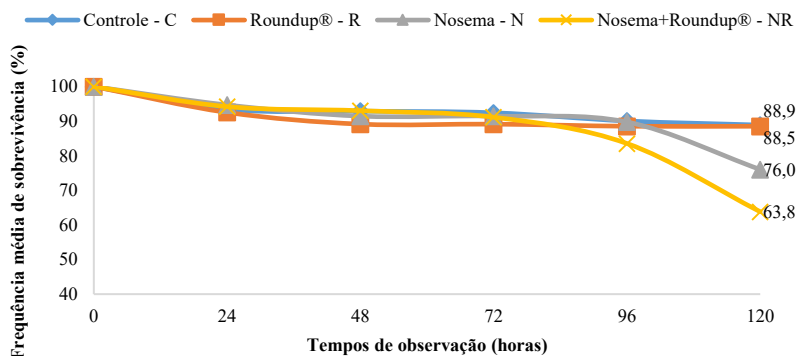


Figura 10: Dados da frequência média da sobrevivência de *A. mellifera* oriundas de colmeias que receberam alimentação com ou sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp., 40 dias antes do início dos testes e que foram submetidas a diferentes tratamentos em BOD.

Diferente do que foi observado por Wu et al. (2012) em seu trabalho com inseticidas e fungicidas, não foi identificado maior mortalidade ou infecção por *Nosema* sp. nos indivíduos que receberam Roundup® ainda na fase larval. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, abelhas provenientes de colmeias que receberam alimento contendo Roundup® antes do início dos testes de sobrevivência (IS 2), apresentaram menor mortalidade quando comparadas àquelas que foram expostas ao herbicida somente após a emergência (IS 1). Além da variabilidade genética natural presente nos diferentes grupos de operárias, é possível que a maior sobrevivência esteja associada a sua dieta larval com pólen de melhor qualidade nutricional. As abelhas utilizadas no segundo bioensaio de sobrevivência (IS-2), tiveram seu desenvolvimento larval em período de maior disponibilidade de pólen, devido a plena floração da mata nativa adjacente ao apiário. O pólen é um alimento com propriedades antioxidantes, possivelmente devido a presença de ácidos fenólicos e compostos ubíquos em plantas que atuam eliminando radicais livres (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005; KRISHNAIAH et al., 2011; FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ et al., 2013; PASCOAL et al., 2014). O excesso de alimento ingerido neste período é armazenado no corpo gorduroso, garantindo reserva de nutrientes necessários à metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009) e que poderia garantir menores interferências na síntese de vitelogenina ou danos devido ao acúmulo de espécies

reativas de oxigênio no período pós emergência. Compreende-se que em condições naturais, a relação de uma dieta monofloral, devido a práticas de monocultura ou pela redução da vegetação devido a aplicação de herbicidas como o Roundup®, e resíduos deste produto no alimento coletado e transportado às colmeias, tenham efeito significativo na mortalidade de operárias adultas.

7.4.2 Consumo de alimento

As medidas de consumo de alimento que foram realizadas durante os testes para a avaliação do índice de sobrevivência, mostraram diferenças significativas entre os tratamentos e nos tempos avaliados (Tabela 6 e Figura 11).

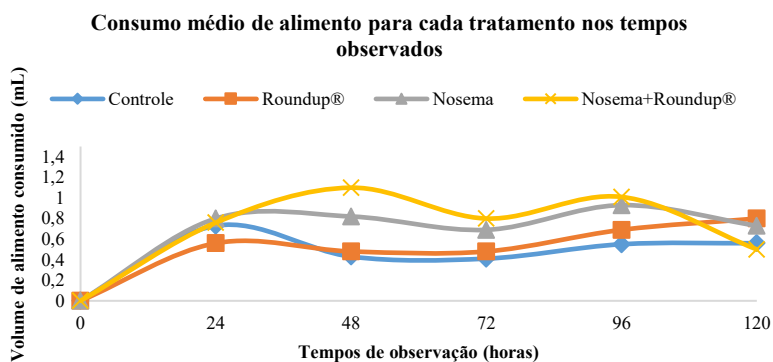


Figura 11: Consumo médio de alimento em cada tempo de observação durante o teste de sobrevivência de abelhas alimentadas com e sem a presença de Roundup® e *Nosema* sp.

Tabela 6: Consumo médio de alimento (mL), em cinco tempos de avaliação para cada um dos tratamentos, em função dos testes de sobrevivência, durante o período de 120 horas.

Tratamento	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
T1	0,73 a A	0,43 b A	0,41 a A	0,55 ab A	0,56 a A
T2	0,56 a A	0,48 b A	0,48 a A	0,69 ab A	0,80 a A
T3	0,80 a A	0,82 a A	0,69 a A	0,93 ab B	0,73 a B
T4	0,76 a B	1,10 a A	0,80 a B	1,01 b B	0,50 b C
CV%	38,23				

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação – CV.

De acordo com os resultados obtidos, o consumo de alimento aumentou com o tempo, sendo maior nos tratamentos onde os indivíduos foram contaminados por *Nosema* sp. Estes dados estão de acordo com o que foi proposto por Alaux et al. (2010), que observaram maior consumo de alimento pelas abelhas infectadas com *Nosema* sp. quando comparadas com àquelas do grupo controle e expostas ao imidacloprid. Mayack e Naug (2009) avaliaram o reflexo de extensão da probóscide (REP) e o consumo de alimento em abelhas infectadas e não infectadas pelo parasita. Estes autores observaram que o grupo infectado, além de consumir maior quantidade de alimento, também respondia mais rápido no teste da REP, sugerindo que as abelhas infectadas tendem a compensar o estresse energético imposto, se alimentando mais. O maior consumo de alimento pode ser explicado pelo mecanismo de ação do microsporídeo, que apresenta uma organização celular simples, não possuindo mitocôndrias e portanto, incapazes de realizar a fosforilação oxidativa com produção de ATP (trifosfato de adenosina) (BURRI et al., 2006; CORNMAN et al., 2009; FORSGREN; FRIES, 2010). Estes parasitas dependem do ATP do hospedeiro, afetando suas necessidades nutricionais e induzindo-o a um estresse energético, especialmente para a germinação dos esporos do microsporídeo (MAYACK; NAUG, 2009; NAUG; GIBBS, 2009; FORSGREN; FRIES, 2010) levando ao aumento no consumo de alimento energético pelas abelhas (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2011) como tentativa de suprir o déficit da ATP. Em condições naturais, abelhas forrageiras têm maior demanda energética devido a intensa atividade de vôo, para a qual utilizam apenas carboidratos como combustível (SACKTOR, 1970), considerando uma situação de infecção por *Nosema* sp., o consumo de alimento tende a ser aumentado.

7.4.3 Infecção por *Nosema* sp.

A avaliação para identificar a infecção por *Nosema* sp. foi realizada em abelhas que morreram ao longo do bioensaio e, também, naquelas que restaram vivas ao final das avaliações. No presente estudo foi também verificada a presença ou não da infecção por *Nosema* sp., para poder relacionar as mortes observadas como sendo efeito parcial ou total do patógeno. Nas abelhas infectadas, observamos pequena quantidade de esporos por indivíduo, mesmo naqueles que permaneceram vivos até o

final do bioensaio. A baixa contaminação pode ser consequência da deficiência nutricional que as abelhas estavam expostas, tendo em vista uma dieta altamente nutritiva promove mecanismos que permitem uma maior proliferação do parasita (PORRINI et al., 2011). Outra possibilidade seria o modo de preparo do alimento, onde na solução contendo esporos de *Nosema* sp. foi adicionado à mistura de mel com água e armazenado sob refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) para ser oferecido às abelhas a cada 24 horas, quando eram substituídos os microtubos de alimento. Em estudos feitos por Higes et al. (2007) de infecção experimental de abelhas por esporos de *Nosema ceranae*, verificaram que este microsporídeo tem sua capacidade de germinação diminuída quando expostos a temperaturas de 4°C por quatro dias ou mais. Ainda assim é possível inferir que a infecção pelo microsporídeo teve efeito aditivo no consumo de alimento e mortalidade das abelhas nos tratamentos T3 e T4 (com infecção por *Nosema* sp.) (Tabela 6).

7.5 CONCLUSÕES

De acordo com o que foi observado no presente estudo, a sinergia da infecção por *Nosema* sp. e a alimentação contendo Roundup® contribuem significativamente na redução da sobrevivência de operárias adultas de *A. mellifera*, além de aumentar o consumo de alimento pelas abelhas expostas a estes agentes estressores. Considerando o modo de ação do Roundup® e do glifosato em organismos não alvo, que provocam prejuízos na síntese bioenergética, a formação de espécies reativas de oxigênio e a inibição na síntese de enzimas que degradam estes compostos, é possível que estes eventos também ocorram em polinizadores. Assim, a redução na síntese bioenergética causada pelo herbicida em conjunto com os efeitos da infecção por *Nosema* sp., induzem o maior consumo de alimento pelas abelhas expostas a essa interação, como uma tentativa de suprir o déficit energético causado pela ação de ambos. A presença de espécies reativas de oxigênio promovem alterações no corpo gorduroso dos insetos, responsável pela produção de inumeros compostos, entre eles, a vitelogenina, proteína associada a longevidade em abelhas.

Em condições naturais, é possível concluir que a interação de uma dieta monofloral e com resíduos de Roundup® tenham efeito significativo na mortalidade de operárias adultas, com consequente comprometimento da capacidade de homeostase da colônia, devido a redução gradativa da população. Neste sentido, o presente trabalho deu um passo importante, pois constatou que a presença de dose subletal do Roundup® no alimento para abelhas com nosemose potencializa os

efeitos de ambos os fatores, Roundup® e *Nosema* sp., o que eleva o potencial letal para as abelhas. No entanto, as doses testadas no presente estudo não reproduzem o espectro de doses utilizadas a campo. Assim, os resultados aqui obtidos podem ser subestimados em relação aqueles que podem estar ocorrendo, se mantidas as práticas de manejo atualmente utilizadas que demandam aplicações de Roundup® em doses e número de aplicações crescentes.

Os efeitos de muitos agrotóxicos sobre organismos não alvo são pouco conhecidos. Em abelhas, as pesquisas concentram-se em abordar os efeitos de inseticidas e pólen de culturas transgênicas, que expressam as proteínas inseticidas do *Bacillus thuringiensis*. No entanto, faltam estudos que abordem os efeitos de herbicidas, como o Roundup® ou mesmo de seu princípio ativo, o glifosato, evidenciando a necessidade estudos mais específicos e detalhados nesta área.

8. CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES EM GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE ABELHAS NUTRIZES (*Apis mellifera* L.) INDUZIDAS POR DOSES SUBLETAIS DO HERBICIDA ROUNDUP® EM PÓLEN E AS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL

8.1 RESUMO

A diminuição das populações de polinizadores em todo o mundo tem gerado grande preocupação e estimulado inúmeros estudos para compreender a origem das perdas de colônias. O uso indiscriminado de diferentes agrotóxicos está entre uma das principais causas, produzindo efeitos negativos sutis sobre a fisiologia e o comportamento das abelhas. A geleia real é uma substância proteica essencial para a alimentação de todos os indivíduos da colmeia, especialmente para a rainha, sendo sintetizada nas glândulas hipofaríngeas. O objetivo do presente estudo foi de determinar o efeito de concentrações subletais do Roundup® sobre as glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizas, bem como a interferência na produção de geleia real. Os resultados obtidos indicam que o herbicida promove alterações na ultraestrutura celular destas glândulas, promovendo a degeneração precoce do RER e mudanças morfológicas e estruturais nas mitocôndrias. Não houve alterações na quantidade de geleia real produzida, embora sejam necessários estudos adicionais para determinar possíveis alterações qualitativas da mesma. Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do Roundup® sobre as glândulas produtoras de geleia real evidenciando alterações nestas estruturas que podem desencadear prejuízos no desenvolvimento e sobrevivência das colônias de abelhas.

Palavras-chave:

glifosato/abelhas/sobrevivência/colônias/ultraestrutura/ácinos.

8.2 INTRODUÇÃO

Em *A. mellifera*, as glândulas hipofaríngeas fazem parte das glândulas anexas do sistema digestório, responsáveis pela síntese de enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen e pela produção da geleia real (HUANG et al., 1989 COSTA; CRUZ-LANDIM, 1999). A geleia real, substância de base proteica, é essencial para alimentação de todas as crias nos três primeiros dias de vida larval e, para a rainha, durante toda a vida (DESEYN; BILLEN, 2005; FENG; FANG; LI, 2009; HUANG et al., 2012; KAMAKURA, 2012).

Huang et al. (1989) verificaram que o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas em abelhas operárias pode ser muito variável, sendo afetado por fatores internos e externos à colônia. As diferentes atividades desempenhadas por indivíduos da mesma idade e a presença de larvas jovens são essenciais para a ativação das glândulas hipofaríngeas (SIMPSON et al., 1968; HUANG et al., 1989; LASS; CRAILSHEIM, 1996; PERNAL; CURRIE, 2000; DESEYN; BILLEN, 2005). Moritz e Crailsheim (1987) e Crailsheim e Stolberg (1989), constataram que à medida que as operárias passam a desempenhar atividade de forrageamento, os ácinos das glândulas e a atividade proteolítica diminuem.

A ação de inseticidas neonicotinóides e acaricidas, utilizados respectivamente em lavouras e no interior das colmeias, reduz o tamanho dos ácinos glandulares devido à morte celular nestas estruturas (ALAUX et al., 2010; SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010; HATJINA et al., 2013). Além disso, abelhas nutrizas expostas ao fipronil e piraclostrobina (isoladas ou associação), em um período de seis dias, apresentaram alterações nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas. Em condições de campo, as abelhas podem ser expostas a múltiplos pesticidas e por longos períodos, com importantes impactos negativos sobre suas colônias (ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017).

Sobre o modo de ação dos herbicidas a base de glifosato (HBG) em abelhas, estudos demonstram que ele não interfere na sobrevivência larval até o sétimo dia (THOMPSON et al., 2014) e de operárias adultas (HERBERT et al., 2014; HELMER et al., 2015). Observações feitas por Helmer et al. (2015), mostraram diminuição de β -caroteno em abelhas submetidas à alimentação contaminada com HBG e uma pequena redução nos níveis de proteína. De acordo com Herbert et al. (2014) operárias adultas de *A. mellifera* expostas à alimentação experimental contaminada com glifosato apresentaram redução da sensibilidade à sacarose, prejuízos na aprendizagem e dificuldades em estabelecer memórias associativas, o que poderia tornar ineficaz a coleta de recursos para a colônia, comprometendo sua sobrevivência. Jumarie, Aras e Boily (2017) utilizaram o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliar a peroxidação lipídica induzida por herbicidas a base de atrazina e glifosato e verificaram que as misturas destes herbicidas provocaram um aumento significativo níveis de TBARS, de 30 a 40%, em doses 1% inferiores a DL 50.

É importante considerar que as formulações comerciais de agrotóxicos apresentam ingredientes denominados “inertes” que podem ser ainda mais tóxicos que o glifosato isolado (WILLIAMS; KROES;

MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2012; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012). Alguns destes ingredientes inertes também podem ter efeitos tóxicos sobre abelhas, contribuindo para a diminuição da saúde de suas populações (ZHU et al., 2014; MULLIN et al., 2016) e prejudicando seu desempenho de aprendizagem (CIARLO et al., 2012).

Como os herbicidas não são destinados para uso contra insetos, não possuem indicações de restrição à exposição de abelhas (JOHNSON, 2015), deixando-as em contato com elevadas concentrações quando aplicados em culturas atraentes aos polinizadores no período de floração (PETTIS et al., 2013).

No presente estudo, optou-se por utilizar a formulação comercial do Roundup® em detrimento do glifosato em grau analítico, com a intenção de simular situações reais do uso dos produtos comerciais na agropecuária brasileira. Com o objetivo de determinar o efeito de concentrações subletais deste herbicida na dinâmica de colônias de *A. mellifera*, análises foram feitas nas glândulas hipofaríngeas de operárias adultas, bem como avaliações na produção de geleia real. Alterações que interfiram de algum modo nas glândulas hipofaríngeas podem interferir na sua fisiologia e comprometer a produção de geleia real e, conseqüentemente, ter vários efeitos sobre a dinâmica da colônia, sendo esta avaliação, uma forma de determinar efeitos subletais dos agrotóxicos sobre as abelhas.

8.3 MATERIAL E MÉTODOS

8.3.1 Morfologia e morfometria dos ácinos das glândulas hipofaríngeas

O teste de ativação das glândulas hipofaríngeas a partir da avaliação do tamanho dos ácinos foi composto por três tratamentos, sendo um controle (que correspondeu a alimentação das colmeias com 200mL de alimento energético) e os tratamentos 2 e 3, em que as colmeias receberam alimento contendo 0,75 µL e 1,5 µL de Roundup® em 200 mL de alimento energético (solução A). A alimentação artificial de cada bioensaio foi fornecida às colmeias três semanas antes do início dos testes, sendo que as colmeias permaneceram com entrada livre para o pólen durante o bioensaio.

O experimento foi conduzido entre os meses de setembro a novembro de 2016, seguindo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Cada repetição foi composta por 60 abelhas operárias que, após emergirem na B.O.D, foram marcadas no tórax com tinta

atóxica (Posca Paint Pens, Mitsubishi Pencil, Japan) e devolvidas às colmeias de origem (Figura 12, A e B), que continham rainha em plena postura e cria em diferentes estágios de desenvolvimento, onde foi fornecido o alimento referente a cada um dos tratamentos. No sexto dia após a reintrodução na colmeia, 30 abelhas foram retiradas, fixadas por 48 horas em solução fixadora Dietrich e posteriormente, acondicionadas em álcool a 70%.

Das 30 abelhas fixadas, 10 foram dissecadas e as glândulas hipofaríngeas extraídas e preparadas em lâminas de vidro com Meio de Hoyer, cobertas com lamínula e acondicionadas em estufa por sete dias em temperatura de 60°C para secar. Posteriormente, para observações e registro das imagens, as lâminas foram analisadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para observar e medir a área dos ácinos (μm^2), foram fotografados pelo menos dez ácinos das glândulas de cada abelha, sendo determinados aleatoriamente, totalizando 100 ácinos por repetição. As imagens registradas foram feitas a partir da autofluorescência da glândula, que foi excitada com um laser com comprimento de onda 488nm (azul) e o espectro de emissão resultante foi de 500 a 600 nm (faixa do verde ao amarelo). Os ácinos foram registrados em imagens, e avaliados morfometricamente (Figura 12-C) com auxílio do programa LAS-AF Lite (Leica).

Para verificar a diferença entre os ácinos em função dos tratamentos, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa ASSISTAT ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste F.

As avaliações morfológicas foram realizadas a partir de imagens registradas em microscópio estereoscópio Opticam, processadas com software Opticam Microscopia (OPTHD – 3.7.4103), no Laboratório de Entomologia Agrícola, no Centro de Ciências Agrárias – UFSC.

8.3.2 Histologia e Ultraestrutura das Glândulas Hipofaríngeas

Os bioensaios para avaliar a histologia e ultraestrutura de células das glândulas hipofaríngeas (GH) foram compostos por dois tratamentos: tratamento controle - que correspondeu a alimentação das colmeias com xarope de açúcar invertido; tratamento “Roundup®” - onde as colmeias receberam 200 mL de alimento energético misturados e 60g de pólen contendo 1,5 μL de Roundup®, oferecidos no alimentador de superfície.

A entrada de pólen nas colmeias do tratamento com Roundup® foi restringida durante todo o período do experimento, a partir da instalação de coletores de pólen em seus alvados, com a intenção de garantir que se alimentassem apenas do alimento proteico fornecido, o qual continha adição do herbicida. As colmeias foram submetidas a esta alimentação artificial nas três semanas que antecederam a coleta das abelhas.

O experimento inicialmente conduzido entre os meses de setembro a novembro de 2016, foi repetido a partir do mês de agosto de 2017, devido a necessidades de ajustes na metodologia. No período entre as repetições dos bioensaios, três colmeias que receberam alimento contendo Roundup® tiveram uma redução drástica em suas populações e acabaram morrendo, portanto, optou-se em conduzir o novo experimento com apenas dois tratamentos, devido ao número insuficiente de colmeias.

Os bioensaios seguiram delineamento inteiramente casualizado com três repetições, composta por 20 abelhas operárias que emergiram na B.O.D. Essas abelhas foram marcadas no tórax com tinta atóxica (Posca Paint Pens, Mitsubishi Pencil, Japan) e devolvidas às colmeias de origem (Figura 12, A e B) onde foi fornecido o alimento referente a cada um dos tratamentos. No sexto dia após a reintrodução, foram retiradas cinco abelhas de cada colmeia e após serem imobilizadas manualmente, a cabeça de cada uma delas foi seccionada e fixada em glutaraldeído 5% tamponado em cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4), onde permaneceram por 24 horas. Posteriormente, foram dissecadas para extração das glândulas hipofaríngeas, que foram mantidas em solução tampão cacodilato de Sódio 0,1M até a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio, seguindo então a etapa de desidratação em concentrações crescentes de álcool e posterior infiltração em resina SPURR. As amostras já infiltradas e incluídas em resina ficaram em estufa a 70°C, por 24 horas, para completa polimerização da resina, posteriormente os blocos das amostras (em resina) foram processados para ultramicrotomia.

Para a análise de histologia, foram feitos cortes semifinos (700µm), transferidos para lâminas de vidro e corados com azul de toluidina. Posteriormente foram observados em campo claro em microscópio óptico de fluorescência e as imagens obtidas foram processadas com o programa LAS-AF Lite (Leica). Para a análise da ultraestrutura das glândulas hipofaríngeas, foram feitos cortes ultrafinos (60 a 70µm), contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1011 TEM, a uma tensão de aceleração dos elétrons de 80kV. As imagens obtidas foram processadas com o software Gatan Digital Micrograph.

O preparo das amostras e o registro das imagens foram feitos no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

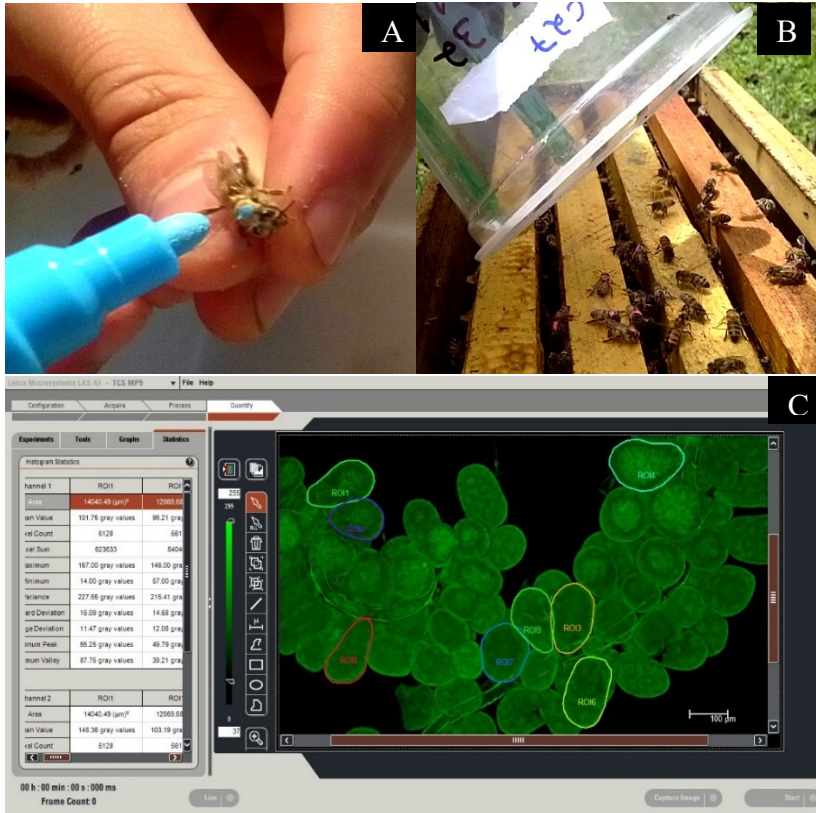


Figura 12: Identificação das operárias logo após a imergência (A). Reintrodução das abelhas já identificadas na colmeia (B), *Faita, 2016*. C - Obtenção de medidas dos ácinos das glândulas hipofaríngeas com o programa LAS-AF (*Leica*), *Faita, 2017*.

8.3.3 Produção de Geleia Real

A produção de geleia real realizada no mês de novembro de 2017, seguindo o método descrito por Doolittle (1899) para produção das rainhas, que consiste na transferência de larvas de sua célula de origem, para cúpulas artificiais de acrílico contendo geleia real. Os bioensaios para produção de geleia real e aceitação das larvas foi conduzido nas

mesmas colmeias utilizadas nos bioensaios para obtenção de abelhas para análise das glândulas hipofaríngeas. Estas colmeias foram orfanadas 24 horas antes da introdução dos favos com larvas, mantidos os coletores de pólen de alvado e alimentadas de acordo com o tratamento correspondente (alimento energético e solução B).

As larvas de primeiro instar foram obtidas de um favo de crias de operárias de uma colmeia fornecedora, que foi manejada para estar livre de doenças, ter rainha sadia e com boa taxa de postura. As cúpulas de acrílico foram fixadas em sarrafos transversais, presos na parte central de um favo de cria. Cada sarrafo recebeu 40 cúpulas, totalizando 80 em cada favo destinados a produção de geleia real. A transferência das larvas dos favos de cria para as cúpulas de acrílico foi realizada com auxílio de uma agulha de enxertia de larvas. Cada cúpula continha uma gota de geleia real diluída em água destilada (1:1).

Os favos contendo as 80 cúpulas com as larvas transferidas foi introduzido nas colmeias que compunham os tratamentos e avaliados após 72 horas. A geleia real coletada foi armazenada em microtubos de polipropileno de 1,5 mL de volume e mantido sob refrigeração (-24°C). Foi avaliado o número de larvas aceitas e o peso total de geleia real produzida em cada uma das seis colmeias. Os dados foram submetidos às análises de variância, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, no programa ASSISTAT®. As variáveis que apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade ($\alpha = 0,05$) pelo teste F, foram submetidas ao teste de Tukey ao mesmo nível de significância.

8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.4.1 Morfologia e morfometria dos ácinos das glândulas hipofaríngeas

Os resultados obtidos na análise da morfometria das glândulas hipofaríngeas para a medida da área dos ácinos, não indicaram diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 7). De acordo com o teste F, não foram encontradas diferenças significativas ao nível de 1% e 5% de probabilidade.

Tabela 7: Quadro de análise de variância da área dos ácidos das glândulas hipofaríngeas (μm^2).

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	28626210.4616200	14313105.2308	0.6917 ns
Resíduo	6	124152497.5757	20692082.9293	
Total	8	152778708.0373		

Foi observado que, independentemente do tipo de alimentação, as abelhas apresentaram ácidos glandulares com tamanho correspondente aos de glândulas ativas. A área média dos ácidos foi de $36,879 \pm 4,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, dados semelhantes aos descritos por Crailsheim e Stolberg (1989), Deseyn e Billen (2005) e Zaluski, Justulin e Orsi (2017) (Figura 14). A partir desta análise, é possível inferir que pela avaliação morfométrica dos ácidos, o herbicida Roundup® não afeta a ativação das glândulas hipofaríngeas e/ou as abelhas nutrizas não consumiram alimento contendo herbicida em quantidade suficiente para reduzir o tamanho dos ácidos glandulares.

A aparência e o tamanhos dos ácidos das glândulas hipofaríngeas reflete seu estado funcional (MAURIZIO, 1954). Huang et al., (1989) encontraram uma relação positiva entre o tamanho dos ácidos e a atividade glandular, entretanto, afirmam que não é o tamanho da glândula que determina se ela está ativa ou não, sendo que uma glândula grande pode ter a síntese proteica inibida caso não ocorra excreção, devido a um mecanismo de *feedback* negativo. Para Brouwers (1982), o tamanho dos ácidos não está diretamente relacionado com a atividade celular das glândulas. Deste modo, é possível que mesmo sem apresentar diferenças significativas no tamanho dos seus ácidos, as atividades celulares destas estruturas estejam comprometidas em função dos tratamentos administrados.

A idade e a função que as abelhas desenvolvem dentro da colmeia (WILSON, 1971; MICHENER, 1974) é um dos fatores que induzem a ativação das glândulas, sendo o contato das abelhas nutrizas com área de cria essencial para a síntese de proteínas (BROUWERS, 1982; HUANG; OTIS; TEAL, 1989; MORITZ; CRAILSHEIM, 1987; LASS; CRAILSHEIM, 1996). Todas as colmeias que compunham o bioensaio apresentavam rainha com boa taxa de postura e larvas jovens, em diferentes estágios de desenvolvimento. Uma vez que a relação entre o tamanho da glândula e a atividade não é direta, o uso da morfologia e/ou

do tamanho da glândula como medidas para estimar sua atividade (HASSANEIN, 1952; MAURIZIO, 1954) pode não ser adequado.

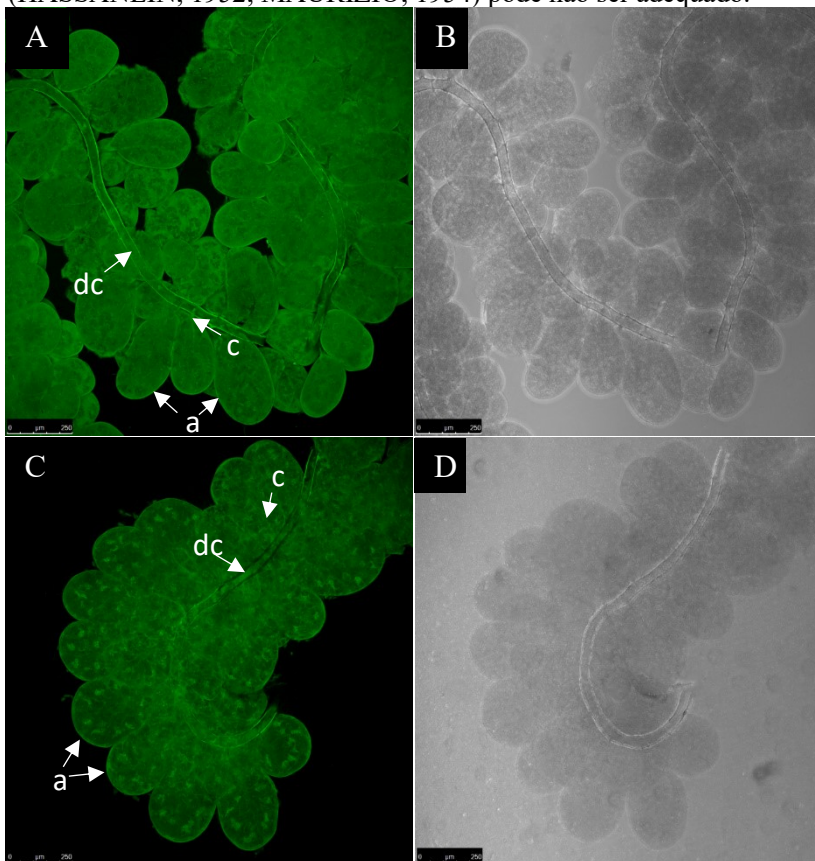


Figura 13: Glândulas hipofaríngeas de abelhas com seis dias de idade após a emergência. Micrografias A e B correspondem a glândulas de abelhas de uma colmeia controle e as micrografias B e C, são de indivíduos que receberam alimentação contendo Roundup®. Nestas imagens não foram observadas diferenças nos tamanhos dos ácinos entre os tratamentos, o que foi confirmado a partir das medidas efetuadas. Micrografias obtidas com Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany), capturadas com auxílio do programa LAS-AF Lite (Leica).

Embora o tamanho dos ácinos não se diferenciem em relação aos tratamentos, foram observadas alterações morfológicas nas glândulas hipofaríngeas de abelhas provenientes das colmeias que receberam alimento contaminado com Roundup®. Nestes indivíduos, a glândula

apresentava-se com aspecto esponjoso, com ácidos extremamente túrgidos, sugerindo o acúmulo de secreção no interior dos mesmos (Figura 14-A) quando comparadas aos indivíduos do grupo controle (Figura 14-B). Esta característica foi identificada em 70% das abelhas analisadas durante a preparação das lâminas para as observações e registro das imagens sob microscopia confocal. De acordo com Deseyn e Billen (2005) e Elaidy (2014), a atividade de síntese proteica nas células dos ácidos é assíncrona e glândulas grandes podem indicar ausência de excreção do material secretado (HUANG et al., 1989), sendo possível que as células desses ácidos estejam com acúmulo de substância sintetizada, o que lhes confere tal aspecto. Ainda é possível que os tratamentos administrados às colmeias promovam alterações fisiológicas nas abelhas, interferindo no funcionamento das glândulas hipofaríngeas. Com a repetição dos bioensaios, foram coletadas abelhas para testes de histologia e ultraestrutura, além da produção de geleia real, a fim de verificar a ocorrência de alterações evidenciadas devido a adição do Roundup® ao alimento das colmeias.

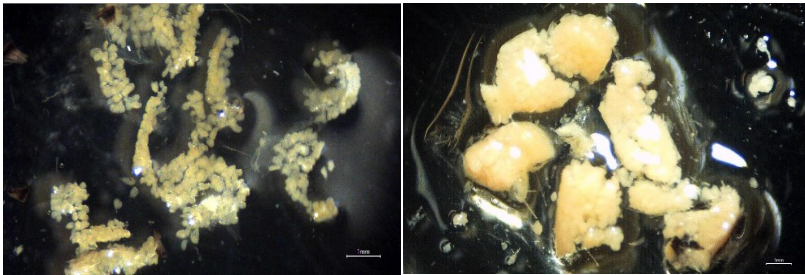


Figura 14: Glândulas hipofaríngeas de abelhas com idade de seis dias após a emergência. A – glândulas de operária proveniente de colmeia do grupo controle; B- glandulas de abelha operária proveniente de colmeia que recebeu alimento contendo Roundup®, apresentando ácidos túrgidos com aspecto esponjoso. Imagens registradas em Lupa Opticam, processadas com software Opticam Microscopia OPTHD – 3.7.4103. Aumento de 40x, barra de escala de 1mm. Fonte: Faíta, 2017.

8.4.2 Histologia das Glândulas Hipofaríngeas

Estudos histológicos foram realizados para avaliar o efeito do alimento contendo Roundup® sobre as glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizas. Foi observado e registrado a distribuição das células secretoras, o tamanho e a forma dos núcleos, a presença de vesículas secretoras de geleia real e o grau de coloração do citoplasma celular.

Os resultados mostraram que a estrutura das glândulas hipofaríngeas está de acordo com descrições anteriores, para abelhas com seis dias de idade após a emergência (CRUZ-LANDIM; HADEK, 1969; DESEYN; BILLEN, 2005; SMODIŠ; GREGORC, 2015). Histologicamente apresentaram-se preservadas (Figura 15), sendo possível visualizar ácinos esféricos, com as células secretoras agrupadas em seu interior, contendo várias vesículas de geleia real, canais intracelulares e ductos coletores. Estas características estão de acordo com glândulas hipofaríngeas do tipo 4, descritas para os grupos Meliponini e Apini (COSTA; CRUZ-LANDIM, 2002; CRUZ-LANDIM, 1992; 2009) e para abelhas da espécie *A. mellifera* (SUWANNAPONG et al., 2010; AL-GHAMDI et al., 2011). A distribuição das células secretoras no interior dos ácinos e o grau de coloração do citoplasma é semelhante entre os dois grupos. Foi possível observar claramente os núcleos, com tamanho e a forma irregulares, devido ao aumento das vesículas de secreção no citoplasma, e grande número de nucléolos em seu interior.

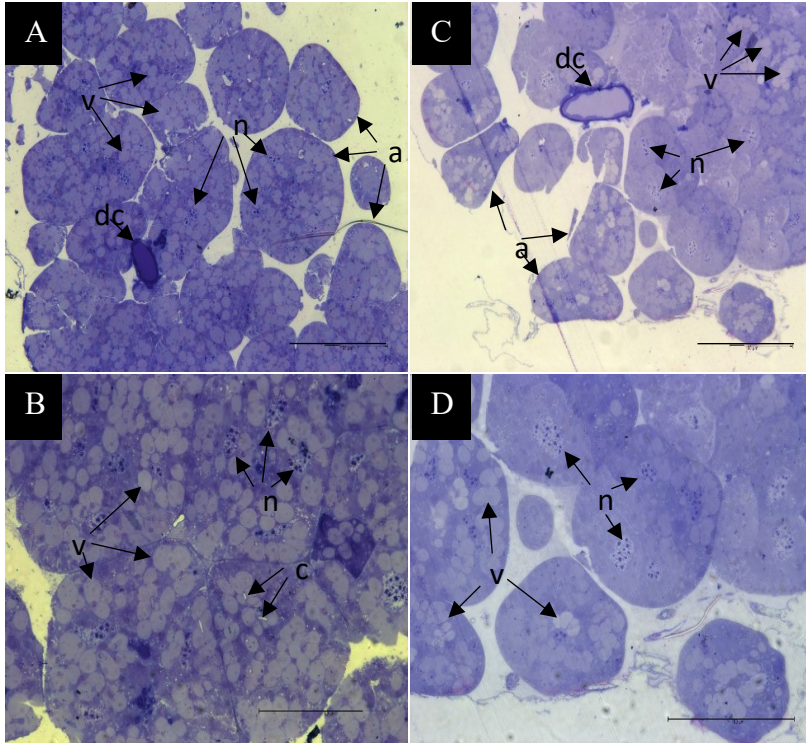


Figura 15: Micrografias de cortes de glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera*, com seis dias de idade após a emergência, coradas com azul de toluidina. Os indivíduos do grupo controle estão representados pelas micrografias A e B; Micrografias C e D representam indivíduos do grupo que recebeu alimento contendo Roundup®. Não foram observadas diferenças histológicas entre os indivíduos de cada tratamento. Contudo, as vesículas de geleia real são mais facilmente observadas nas imagens obtidas dos indivíduos do grupo controle. a = ácinos; cc = canaliculo coletor; dc = ducto coletor; n = núcleo; vs = vesículas de secreção. Barra de escala 100 µm.

Adicionalmente, foi observado que as vesículas de secreção apresenta-se em maior quantidade nas micrografias das abelhas do grupo controle (Figura 16 – A e B), quando comparadas àquelas do grupo que recebeu alimento contendo o herbicida (Figura C e D), indicando alterações no padrão de síntese proteica nas glândulas destes indivíduos. Em estudos sobre os efeitos de agrotóxicos (inseticidas, acaricidas e fungicidas) sobre as glândulas hipofaríngeas, foi descrito a ocorrência de morte celular apoptótica e necrótica nestas estruturas (SMODIS-SKERL;

GREGORC, 2010), além de mal formações e redução no tamanho dos ácinos por efeito de pesticidas (SMODIS-SKERL; GREGORC, 2010; HEYLEN et al., 2011; HATJINA et al., 2013; RENZI et al., 2016; ZALUSKI et al., 2017). No entanto, no presente estudo não foi investigado a ocorrência morte celular por efeito do Roundup® e considera-se importante a realização de estudos adicionais para verificar a ocorrência deste evento.

8.4.3 Ultraestrutura das Glândulas Hipofaríngeas

Para avaliar o efeito citotóxico do alimento contendo Roundup® sobre as células das glândulas hipofaríngeas, estas estruturas foram submetidas a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), técnica que permite avaliar a ultraestrutura das células.

Na análise, foram observadas diferenças significativas nas células glandulares das abelhas provenientes de colmeias que receberam alimentação contendo Roundup® quando comparadas com aquelas do grupo controle. Essas diferenças foram mais acentuadas em estruturas como retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias. Em condições normais, células secretoras ativas apresentam RER bem desenvolvido e organizado, indicando intensa síntese de material proteico para exportação, além de vesículas de secreção de geleia real e enzimas (COSTA; CRUZ-LANDIM, 2002; CRUZ-LANDIM, 1992; 2009). As mitocôndrias são consideradas biossensores confiáveis para avaliação do potencial da toxicidade de compostos químicos *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de entender e prever efeitos adversos de inúmeras substâncias (PEREIRA et al., 2012).

Nas micrografias do presente trabalho, foi possível identificar o RER e as vesículas de secreção de geleia real, sendo que no grupo controle estas vesículas estão em maior quantidade (Figura 17 - A, C, E e G), indicando atividade de síntese proteica mais intensa. Observa-se também que nos indivíduos de colmeias que receberam alimento contendo Roundup®, o RER se apresenta fragmentado e descontínuo, com grandes espaços entre suas membranas (Figura 17 - B, D, F e H), assemelhando-se às células de abelhas forrageiras que não estão mais desenvolvendo atividades de nutrízes, secretando geleia real e, desse modo, apresentam regressão das células que compõe as glândulas hipofaríngeas. Este aspecto do RER foi observado e descrito por Deseyn e Billen (2005) e Elaidy (2014), quando avaliaram a ultraestrutura de glândulas hipofaríngeas em abelhas forrageiras, com 27 dias de idade. A partir destas observações é possível afirmar que o tratamento

administrado às abelhas promove alterações na ultraestrutura celular destas glândulas compatíveis aos eventos de envelhecimento e degeneração destas estruturas.

Além disso, foi observado que o citoplasma de algumas células do grupo tratado com alimento contendo Roundup® apresentou-se mais eletrondenso (Figura 16 - B) e/ou edemaciado (Figura 16 - D e F), formando uma massa citoplasmática livre de organelas, semelhante ao que é descrito para processos de morte celular. Luo et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes doses de Roundup® sobre hepatócito L-02 e observaram que os grupos que receberam doses baixas do herbicida (60 e 90 mg L⁻¹) por 24 horas, mostraram alterações características da morte celular apoptótica, enquanto o grupo exposto a doses maiores (150 e 180 mg L⁻¹) apresentaram alterações de morte celular necrótica. De acordo com seus resultados, o mecanismo de apoptose induzida pelo Roundup está associado ao aumento da concentração de Ca⁺² no citosol, alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a liberação do citocromo c para o citoplasma. Estes eventos observados e descritos por Luo et al. (2017) estão relacionado com a apoptose por via intrínseca, pois estimulam o desenvolvimento de falhas metabólicas relacionadas ao colapso energético da síntese de ATP, devido as alterações na cadeia transportadora de elétrons e favorecendo a liberação das proteínas pró-apoptóticas, principalmente o citocromo c (KROEMER, 2003; GRIVICICH et al., 2007; MAMMUCARI; RIZZUTO, 2010).

Ainda são escassos estudos específicos sobre os efeitos que o Roundup® ou o glifosato causam em abelhas, no entanto, é provável que os danos celulares observados em organismos não alvo, como os descritos por Gomes e Juneau (2016) e Luo et al., (2017), também ocorram em abelhas e sejam a causa das alterações na ultraestrutura celular observadas no presente trabalho.

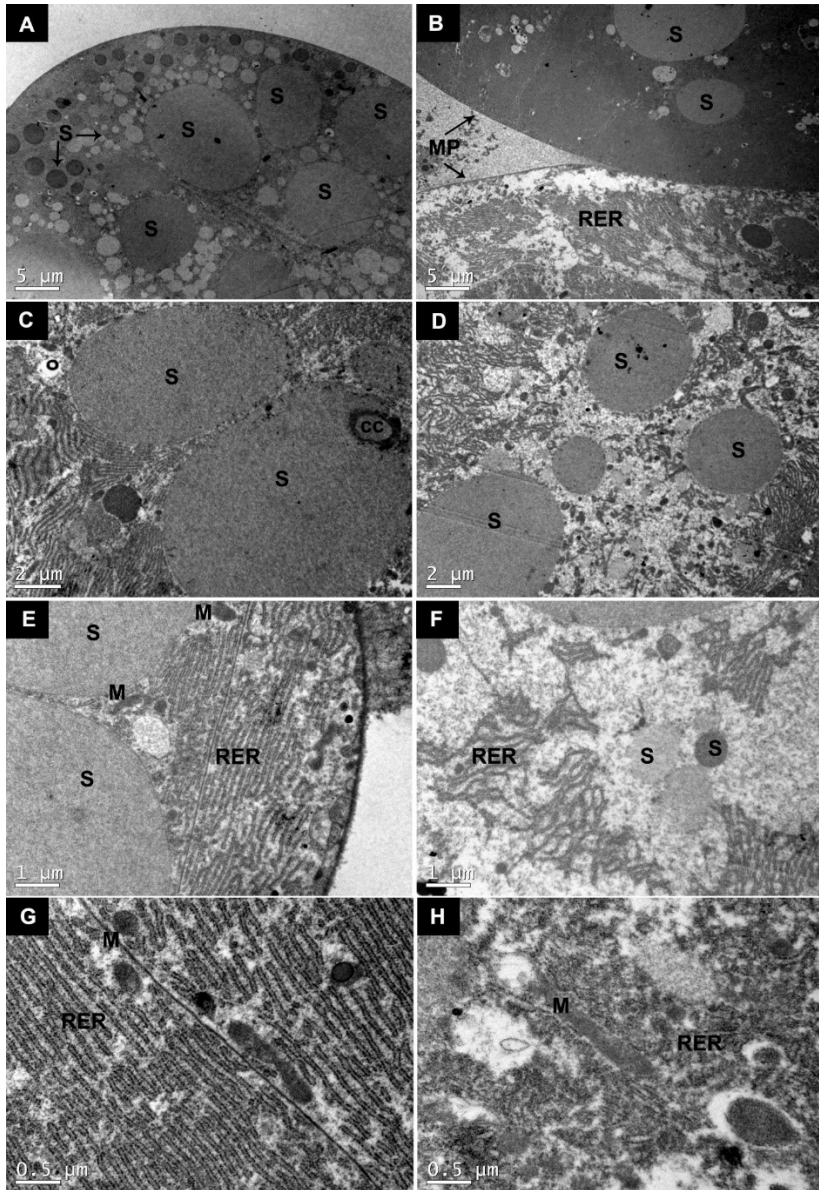


Figura 16: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngea de operárias de *A. mellifera* com seis dias após a emergência. Tratamento controle (A, C, E, G) e tratamento com Roundup® (B, D, F e H);

secreção (S); mitocôndrias (M); retículo endoplasmático granular (RER); canal coletor (CC).

Com relação às mitocôndrias, as micrografias das glândulas de abelhas expostas a alimentação contendo Roundup® revelaram alterações morfológicas destas organelas (Figura 17, D-F), que apresentaram formato anelar dentre outras alterações, diferente daquelas observadas nas micrografias do grupo controle (Figura 17, A-C). É provável que estas alterações ocorreram devido ao efeito do tratamento que estas abelhas foram submetidas. De acordo com Ding et al. (2012) as mitocôndrias sofrem alterações estruturais dinâmicas para atender a necessidade de manter a homeostase, em resposta ao dano oxidativo mitocondrial, apresentando forma de anel ou em forma de “C”.

Observa-se também que as membranas das cristas mitocondriais estão mais íntegras nas micrografias dos indivíduos do grupo controle, podendo ser claramente identificadas (Figura 17, A-C). De acordo com Cruz-Landin (2009), durante a fase secretora, as células das glândulas hipofaríngeas apresentam mitocôndrias com cristas pouco nítidas. Contudo, são conhecidas as mudanças que o herbicida Roundup® e o glifosato provocam no metabolismo celular de organismos não alvo, aumentando o estresse oxidativo que induz a peroxidação lipídica, resultando na ruptura de membranas e alterando a integridade ou funções celulares (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993). Estas mudanças incluem modificações nas cristas mitocondriais, interferência na via metabólica na síntese de glutatona com desequilíbrio do sistema de oxidação e antioxidação, alterações na cadeia transportadora de elétrons com liberação do citocromo c mitocondrial para o citoplasma, aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução das funções energéticas das mitocôndrias, peroxidação lipídica e aumento da permeabilidade das membranas celulares (GOMES; JUNEAU, 2016; LUO et al., 2017; JUMARIE et al., 2017). Considerando estes efeitos causados pelo Roundup®, é provável que as alterações mitocondriais observadas no presente trabalho ocorram em função do herbicida presente na alimentação fornecida às abelhas. Ainda é possível inferir que estas organelas sofram redução de suas funções bioenergéticas, desencadeando outros danos celulares. Contudo, para compreender quais eventos contribuíram para promover as alterações observadas nas mitocôndrias, são necessários estudos específicos adicionais tais como avaliação das enzimas antioxidativas, como a glutatona peroxidase, e níveis de EROs.

Não foram encontradas alterações morfológicas na estrutura do núcleo nas micrografias analisadas, independente do tratamento (Figura

18). Devido as alterações observadas em outras estruturas celulares, seria aceitável que algum dano também atingisse o núcleo. De acordo com Luo et al. (2017), o aumento excessivo de EROs induziram danos celulares e apoptose, causando o colapso do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e conseqüente diminuição na produção de ATP, atacando o DNA e interferindo no ciclo celular. Contudo, é possível que a ausência de alterações seja devido ao curto tempo que as abelhas estiveram expostas a alimentação contendo Roundup®. Ainda assim, os danos observados em mitocôndrias e retículo endoplasmático granular são suficientes para demonstrar o quanto este herbicida é prejudicial às células das glândulas hipofaríngeas e quanto isso pode comprometer a viabilidade das colônias, tendo em vista a grande importância destas estruturas na produção de geleia real.

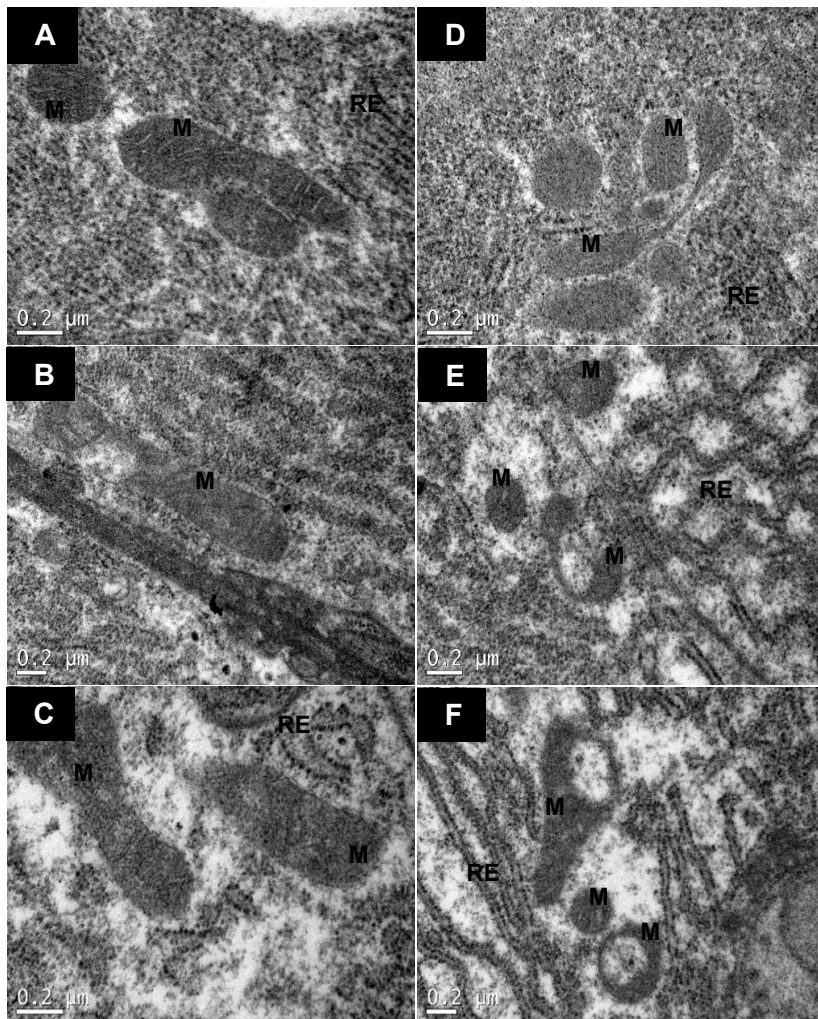


Figura 17: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngeana de operárias de *A. mellifera* com seis dias de idade após a emergência. Tratamento controle (A - C) onde é possível identificar as cristas mitocondriais. Tratamento com Roundup® (D - F) é possível identificar mitôndria em formato de “C” e anelar e alterações na ultraestrutura do REG; retículo endoplasmático granular (REG); vesícula de secreção (S); mitocôndrias (M).

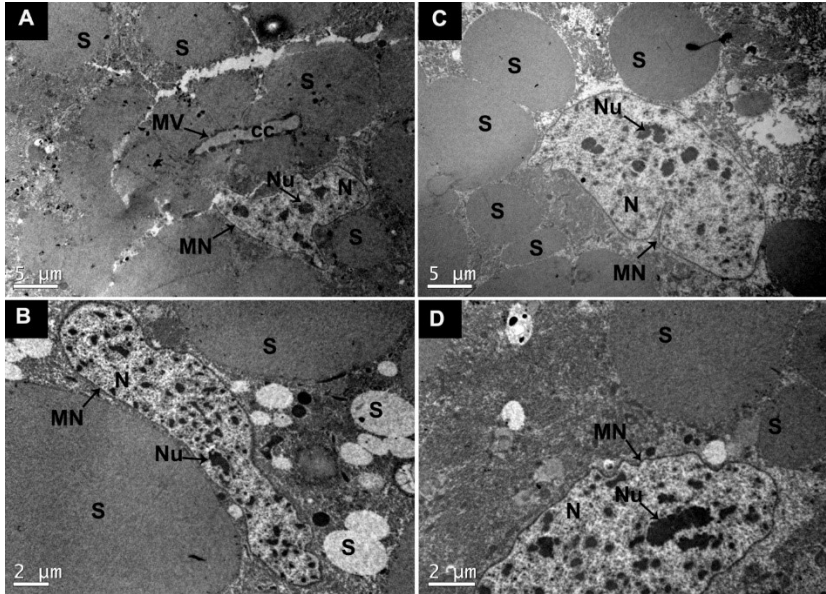


Figura 18: Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células da glândula hipofaríngea de operárias de *A. mellifera* com seis dias de idade após a emergência. Tratamento controle (A e B); Tratamento Roundup® (C e D). Nas micrografias é possível observar o núcleo, com múltiplos nucléolos e carioteca íntegra. Não foram observadas alterações em suas estruturas devido aos tratamentos administrados às abelhas.

Os resultados obtidos no presente trabalho não demonstram alterações na morfometria e histologia das glândulas hipofaríngeas das abelhas que receberam alimento contendo Roundup®. Contudo, foi possível identificar claramente alterações na ultraestrutura celular destes indivíduos, nos quais o RER mostrou-se fragmentado e descontínuo, indicando degeneração dessas estruturas, como acontece nas células de abelhas campeiras. A degeneração prematura destas células pode fazer com que as abelhas operárias antecipem a tarefa de forrageamento, diminuindo o número de indivíduos que permanecem na colmeia executando tarefas de cuidados com a cria. Uma das consequências seria a redução na produção da ninhada, com efeitos negativos para o desenvolvimento da colônia, e também um menor tempo de vida para as operárias adultas (HATJINA et al., 2013).

Os danos às células das glândulas hipofaríngeas também podem afetar quantidade e/ou qualidade da geleia real produzida, comprometendo a alimentação da rainha e das larvas em fase inicial de

desenvolvimento. Estudos conduzidos por Wessler et al. (2016) revelaram que abelhas submetidas a exposição crônica de neonicotinóides apresentaram uma redução de 80% na síntese de acetilcolina não-neural (ACh) devido a morte das células cuticulares do canal coletor, onde a ACh é produzida. Em bioensaios de criação larval artificial, onde o alimento oferecido foi suplementado em 100% com ACh, a sobrevivência das larvas diferiu significativamente daquele em que o alimento não continha esse neurotransmissor. Embora o papel biológico da ACh não seja totalmente conhecido para o desenvolvimento larval de abelhas, considera-se possível que esteja envolvida com o seu desenvolvimento trófico, além de representar um composto de amônio com ação antimicrobiana nestas larvas (WESSLER et al., 2016). Deste modo, considera-se importante o desenvolvimento de estudos para avaliar alterações na qualidade da geleia real produzida por abelhas expostas ao Roundup®, para compreender a magnitude dos efeitos deste herbicida sobre os polinizadores.

8.4.4 Produção de Geleia Real

As avaliações para verificar possíveis alterações na quantidade de geleia real produzida e aceitação das larvas em função dos tratamentos administrados às colmeias, não revelaram diferenças estatísticas significativas em nenhuma das variáveis ($p=0,82$ aceitação de larvas; $p=0,17$ quantidade de geleia real), a 5% de probabilidade. Ainda assim, as colmeias que receberam alimento contendo Roundup® apresentaram peso médio de geleia real, inferior as colmeias do tratamento controle (0,167 mg e 0,287 mg por realeira, respectivamente). De acordo com Li e Aiping (2003) e Garcia e Couto (2005), além de componentes genéticos que sofrem interferência de fatores internos e externos às colônias, existem interações biológicas e comportamentais das abelhas que estão relacionados a produção de geleia real.

A partir dos danos observadas na ultraestrutura das células que compõe as glândulas hipofaríngeas, descritos neste trabalho, é possível inferir que o tempo de exposição a doses subletais do herbicida não foi suficiente para reduzir a quantidade de geleia real produzida pelas colônias, ao nível de ser estatisticamente significativa. Entretanto, além da quantificação, seria importante fazer a análise da qualidade nutricional da geleia real produzida e verificar se houveram alterações em função dos tratamentos. Não foi possível realizar esta avaliação no presente estudo, devido a quantidade insuficiente de material coletado nas colmeias. Considera-se imprescindível a realização de estudos futuros que possam atender esta demanda e contribuir para esclarecer a magnitude dos riscos

que os agrotóxicos realmente representam às abelhas.

8.5 CONCLUSÕES

Com base nos nossos conhecimentos, este é o primeiro estudo em que foram avaliados os efeitos do herbicida Roundup® sobre as glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas e as consequências para a produção de geleia real.

A partir dos nossos resultados, é possível afirmar que a alimentação contendo Roundup fornecida às abelhas promove alterações na ultraestrutura celular das glândulas hipofaríngeas, promovendo a degeneração precoce do RER compatíveis aos eventos de envelhecimento e regressão destas estruturas. Deste modo, as células glandulares de abelhas nutrizas, com seis dias de idade, apresentam aspecto de células de abelhas campeiras, com mais de 25 dias de idade após a emergência. Também foram observadas mudanças morfológicas e estruturais nas mitocôndrias que provavelmente diminuem suas funções bioenergéticas, desencadeando outros danos celulares relacionados com a depleção de ATP, como a apoptose. Contudo, para compreender quais eventos contribuíram para promover as alterações observadas, são necessários estudos adicionais, tais como avaliação das enzimas antioxidativas, como a glutathione peroxidase, níveis de EROs e peroxidação lipídica. Não foi identificada redução significativa na aceitação das larvas e na produção de geleia real, mas devido as alterações celulares descritas aqui, considera-se necessário avaliações específicas sobre a qualidade deste produto.

Sabendo da importância da geleia real tanto para as larvas quanto para todos os demais indivíduos da colmeia (CRAILSHEIM, 1992, 1998), compreende-se que os avanços científicos do presente estudo revelam que doses subletais do Roundup® produzem efeitos negativos sutis sobre as abelhas e que podem comprometer a sobrevivência de suas colônias. Contudo, os resultados apresentados estão aquém do que realmente ocorre no ambiente, onde estes insetos estão expostos a uma grande quantidade de pesticidas isolados ou em conjunto, que são transportados e armazenados no interior das colmeias, exercendo efeitos sinérgicos e prolongados (GOULSON et al. 2015) e podem potencializar os danos às glândulas hipofaríngeas, interferindo na qualidade da geleia real. Considerando a importância dos polinizadores para a manutenção do equilíbrio de diferentes ecossistemas (KREMEN, 2004; EARDLEY et al., 2006; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; MOUGA et al., 2012; TOLEDO et al., 2013), assim como para a produção de alimentos e de produtos apícolas, é urgente que agências regulatórias e as

políticas públicas levem em conta os resultados científicos adversos às abelhas que tem sido obtidos pela comunidade científica. Também é urgente, o desenvolvimento de medidas e esforços que visem minimizar a perda de abelhas, independente da espécie, em diferentes locais ao redor do mundo.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É indiscutível a importância das abelhas para a polinização de espécies de plantas nativas e cultivadas, que garantem o equilíbrio de ecossistemas naturais e a produção de alimento. A obtenção dos produtos apícolas, embora sejam de extrema importância para a indústria de cosméticos, alimentícia e farmacêutica, é diminuto diante da relevância do serviço ambiental que é a polinização, gerando lucros diretos e indiretos.

O cenário mundial da crescente diminuição dos polinizadores é diretamente proporcional com a expansão agrícola, o desmatamento e o aumento no consumo de agrotóxicos e cultivo de plantas geneticamente modificadas. O agronegócio é muito competente no convencimento de que estes são os “males necessários” da produção de alimentos, induzindo as pessoas a acatar e reproduzir estas inverdades como justificativas para o desequilíbrio ambiental, proporcionados por estas práticas.

Existe uma real preocupação da comunidade científica em compreender as causas que estão conduzindo para a grande mortalidade das abelhas, relatadas em diferentes partes do mundo, que tem promovido o desenvolvimentos de muitos trabalhos nesta área. Todas as descobertas apontam para a soma de fatores: parasitas, patógenos, agrotóxicos, monocultura, carência nutricional, destruição dos locais de nidificação, entre outros. O principal alvo dos estudos tem sido os inseticidas neonicotinóides, chegando a serem proibidos em alguns países. Contudo, estudos que considerem a exposição crônica e em condições de campo ainda são poucos, assim como aqueles que abordem outros xenobióticos, como fungicidas e herbicidas.

O presente estudo foi proposto com o intuito de gerar informações que pudessem contribuir no entendimento dos efeitos do glifosato sobre as abelhas, além de identificá-lo em análise de resíduos. Estudos sobre a presença de resíduos do herbicida mais utilizado no Brasil e em outros países nos produtos apícolas, bem como em abelhas mortas, são praticamente inexistentes, o que parece no mínimo incoerente. Deste modo, as análises foram planejadas para compreender os efeitos do Roundup® sobre aspectos fundamentais da sobrevivência da colônia que são a interação com patógenos e alterações das glândulas produtoras de geleia real. Os resultados obtidos foram relevantes para o avanço científico, e demonstraram que é necessário expandir as pesquisas para avaliar a magnitude dos prejuízos deste herbicida sobre os insetos sociais e outros organismos não alvo das aplicações de agrotóxicos..

Grande parte dos estudos a respeito dos efeitos dos agrotóxicos em polinizadores referem-se as abelhas da espécie *A. mellifera*, considerada o polinizador mais efetivo, além de produzir grande quantidade de mel e outros produtos apícolas. Entretanto, é possível que os efeitos observados no presente estudo sejam aplicáveis às abelhas nativas tendo em vista que são insetos pertencentes a mesma Ordem taxonômica, que compartilham grande semelhanças comportamentais e de organização.

10. REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.
- AL-GHAMDI, A. A.; AL-KHAIBARI, A. M.; OMAR, M. O. M. Effect of honeybee race and worker age on development and histological structure of hypopharyngeal glands of honeybee. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 2, p. 113–116, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.001>>.
- AL-WAILI, N. *et al.* Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal*, v. 2012, n. Table 1, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/930849/>>.
- ALAUX, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010.
- ALCANTARA, S.; LOHMANN, L. G. Evolution of floral morphology and pollination system in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany*, v. 97, n. 5, p. 782–796, 2010.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B. *et al.* Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, n. 1, p. 105–111, 2005.
- ALVES DA SILVA CUNHA, D.; DOS SANTOS NÓBREGA, M. A.; ANTONIALLI JUNIOR, W. F. Insetos Polinizadores em Sistemas Agrícolas Insect Pollinators in Agricultural Systems. v. 18, n. 4, p. 185–194, 2014.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* GLIFOSATO: PROPRIEDADES, TOXICIDADE, USOS E LEGISLAÇÃO. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- AMDAM, G. V. *et al.* Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, v. 169, n. 2, p. 201–205, 2006.
- AMDAM, G. V. *et al.* Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, v. 39, n. 5, p. 767–773, 2004.
- AMENT, S. A. *et al.* Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology*, v. 214, n. 22, p. 3808–3821, 2011.

Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.060244>>.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS / MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method) Content quoise. v. 2, n. October, p. 1–68, 2016.

ANDREADIS, T. G.; BECNEL, J. J. Microsporidia in Insects. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. [S.l.]: American Society of Microbiology, 1999. p. 447–501. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818227.chap14>>. Acesso em: 19 maio 2017.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.

ANTÚNEZ, K. *et al.* Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 2284–2290, 2009.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual review of entomology*, v. 55, n. 87, p. 207–225, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075550/>>.

BABENDREIER, D. *et al.* Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, v. 36, p. 585–594, 2005.

BAILEY, L.; BALL, B. V. (BRENDA V. . *Honey bee pathology*. [S.l.]: Academic Press, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780120734818>>. Acesso em: 19 maio 2017.

BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIE, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control*, v. 31, p. 196–201, 2013.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BAWA, K. S. Plant-Pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 21, n. 1, p. 399–422, nov. 1990. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.es.21.110190.002151>>

>. Acesso em: 19 maio 2017.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.-E. Benachour 2009.pdf. *Chemical Research in Toxicology*, v. 22, p. 97–105, 2009.

BERVALD, C. M. P. *et al.* Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênica submetidas ao glifosato 1. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2, p. 9–18, 2010.

BHALLI, J. A. *et al.* Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis*, v. 21, n. 2, p. 143–148, 2006.

BOHM, G. M. B. *et al.* Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 192–197, 2008.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 543, n. 3, p. 251–272, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574203000152>>. Acesso em: 19 maio 2017.

BROUWERS, E. V. M. Measurement of Hypopharyngeal Gland Activity in the Honeybee. *Journal of Apicultural Research*, v. 21, n. 4, p. 193–198, 1982.

BURRI, L. *et al.* Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 43, p. 15916–20, 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/103/43/15916.full>>.

CALDERONE, N. W.; PAGE, R. E. Effects of Interactions among Genotypically Diverse Nestmates on Task Specialization by Foraging Honey Bees (*Apis mellifera*) on JSTOR. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 30, n. 3/4, p. 219–226, 1992. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/4600679?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 19 maio 2017.

CARNEIRO, F. F. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. [S.l: s.n.], 2015. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie_Abrasco_02.pdf%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9788445820667000033>.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper

- with glyphosate. *Weed Science*, v. 49, n. Baker 1982, p. 156–163, 2001.
- CHEN, Y. *et al.* Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 97, n. 2, p. 186–188, 2008.
- CHIARI, W. C. *et al.* Polinização por *apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 30, n. 2, p. 267–271, 2008.
- CIARLO, T. J. *et al.* Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, 2012.
- CLAUDIANOS, C. *et al.* A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, v. 15, n. 5, p. 615–636, 2006.
- CORNMAN, R. S. *et al.* Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 6, 2009.
- CORONA, M. *et al.* Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 17, p. 7128–7133, 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0701909104>>.
- COSTA, R. C.; CRUZ-LANDIM, C. DA. Occurrence and morphometry of the hypopharyngeal glands in *Scaptotrigona postica* Lat. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Bioscience Journal*, v. 24, n. 1, p. 97–102, 1999.
- COYLE, J.; PUTTFARCKEN, P. Glutamate Toxicity. *Science*, v. 262, p. 689–95, 1993.
- CRAILSHEIM, K. The Flow of Jelly Within a Honeybee Colony. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 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.
- CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v. 35, n. 8, p. 595–602, 1989.
- CRUZ-LANDIM, C. Glândulas exócrinas presente nos adultos das abelhas

sociais. *Naturalia*, p. 79–84, 1992. Disponível em:

<<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4524908>>. Acesso em: 19 maio 2017.

CURTI, R. N.; ORTEGA-BAES, P. Relationship between floral traits and floral visitors in two coexisting *Tecoma* species (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 293, n. 1–4, p. 207–211, 2011.

DADD, R. H. Insect Nutrition: Current Developments and Metabolic Implications. *Annual Review of Entomology*, v. 18, n. 1, p. 381–420, 1973. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.18.010173.002121>>.

DALLEGRAVE, E. *et al.* Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Archives of Toxicology*, v. 81, n. 9, p. 665–673, 2007.

DECOURTYE, A. *et al.* Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 57, n. 3, p. 410–419, 2004.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÉGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science*, v. 59, n. 3, p. 269–278, 2003.

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. Disponível em:

<http://www.mendeley.com/catalog/original-article-nosema-ceranae-infected-apis-mellifera-europe-since-least-1998-more-virulent-nosema/%5Cnhttp://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=doi∓access=doi∓doi=10.1051/apido:2007037>.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology*, v. 52, n. 1, p. 81–106, 2007. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>>.

DI PRISCO, G. *et al.* Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 46, p. 18466–18471, 2013. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314923110>>.

DING, W. X. *et al.* Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 50, p. 42373–42378, 2012.

DUKE, S. O. *et al.* Isoflavone, Glyphosate, and Aminomethylphosphonic Acid Levels in Seeds of Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 10, p. 340–344, 2003.

EARDLEY, C. *et al.* *Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice*. [S.l.: s.n.], 2006. Disponível em:
<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20093318249.html>>.

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 28, n. 3, p. 379–385, 2009.

ELAIDY, W. K. M. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers with age. *Journal of Apicultural Research*, v. 53, n. 3, p. 377–384, 2014. Disponível em:
<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3896/IBRA.1.53.3.05>>.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 48, n. 2, p. 133–138, 2013. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2013.727664>>.

FAUCON, J. P. *et al.* Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Management Science*, v. 61, n. 2, p. 111–125, 2005.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC genomics*, v. 10, p. 645, 2009.

FENSTER, C. B. *et al.* Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 35, n. 1, p. 375–403, 2004. Disponível em:
<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>>.

FERREIRA, F. A.; ALBERTO, A.; FERREIRA, L. R. Mecanismos de ação de herbicidas. p. 1–4, 2005.

FOKIN, S. I. *et al.* *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a parasite infecting the hypotrichous ciliate *Euplotes*

woodruffi, with observations on microsporidian infections in ciliophora. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 55, n. 3, p. 214–228, 2008.

FORSQREN, E.; FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3–4, p. 212–217, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>>.

FRANCO, R. *et al.* Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions*, v. 188, n. 2, p. 289–300, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.003>>.

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of *Microsporidia*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 2, p. 243–285, 1999.

FREE, J. B. *A organização social das abelhas (Apis)*. - J.B. Free - Google Livros. São Paulo: [s.n.], 1980. Disponível em: <https://books.google.com.br/books/about/A_organiza%C3%A7%C3%A3o_social_das_abelhas_Apis.html?id=e0OBPgAACAAJ&redir_esc=y>. Acesso em: 20 maio 2017.

FREE, J. B. *Insect pollination of crops*. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 1993. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930233533>>. Acesso em: 20 maio 2017.

FREITAS, B. M. *et al.* Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, v. 40, n. 3, p. 332–346, 2009. Disponível em: <<http://www.apidologie.org/10.1051/apido/2009012>>.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA POLINIZAÇÃO*. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/polinizacao3.htm>>. Acesso em: 20 maio 2017.

FRIES, I. *Nosema Apis* - A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World*, v. 74, n. 1, p. 5–19, 1993. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0005772X.1993.11099149>>.

GALLAI, N. *et al.* Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, v. 68, n. 3, p. 810–821, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>>.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. *Alguns aspectos da utilização do*

herbicida glifosato na agricultura. São Paulo: ACADCOM, 2005.

GAMITO, L. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. Visitantes florais e produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Acta Sci. Anim. Sci.*, v. 28, n. 4, p. 483–488, 2006.

GÉREZ, N. *et al.* Occurrence of pesticide residues in candies containing bee products. *Food Control*, v. 72, p. 293–299, 2017.

GIANNINI, T. C. *et al.* The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://jee.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jee/tov093>>.

GLUSCZAK, L. *et al.* Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 65, n. 2, p. 237–241, 2006.

GODFRAY, H. C. J. *et al.* A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 281, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org>>.

GOLDBLATT, P. *et al.* Floral Biology of *Hesperantha* (Iridaceae: Crocoideae): How Minor Shifts in Floral Presentation Change the Pollination System. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 91, n. 1, p. 186–206, 2004.

GOMES, M. P.; JUNEAU, P. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *. *Environmental Pollution*, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.019>>.

GONÇALVES, L.S. 1974. The introduction of the African Bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *American Bee Journal* 114: 414-419.

GONÇALVES, L.S. 1994. A influência do comportamento das abelhas africanizadas na população, capacidade de defesa e resistência a doenças. Anais do I Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto - SP, 69-79 p.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, v. 50, n. 4, p. 977–987, 2013.

- GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, v. 347, n. 6229, p. 1255957–1255957, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1255957>>.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancrologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>.
- GUILLÉN, D. *et al.* Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. *Science of the Total Environment*, v. 440, p. 236–252, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.064>>.
- GUPTA, P. K. CHAPTER 51 – Toxicity of herbicides. *Veterinary Toxicology*. [S.l: s.n.], 2007. p. 567–586. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123704672501486>>. Acesso em: 20 maio 2017.
- GUPTA, P. K. Pesticide exposure - Indian scene. *Toxicology*, v. 198, n. 1–3, p. 83–90, 2004.
- 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7348.1999.tb05269.x>>.
- 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.
- HELMER, S. H. *et al.* Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 11, p. 8010–8021, 2015.
- HENDRIKSMA, H. P.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Testing pollen of single and stacked insect-resistant bt-maize on In Vitro reared honey bee larvae. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, 2011.
- HENRY, M. *et al.* A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science (New York, N.Y.)*, v. 336, n. 6079, p. 348–50, 20 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461498>>.
- HENRY, M. *et al.* Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*:

Biological Sciences, v. 282, n. 1819, p. 20152110, 2015. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rspb.2015.2110>>.

HERBERT, L. T. *et al.* Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *The Journal of experimental biology*, v. 217, n. Pt 19, p. 3457–64, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063858>>.

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. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1051/apido/2010043>>.

HIGES, M. *et al.* Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 94, n. 3, p. 211–217, 2007.

HIGES, M. *et al.* Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, n. 6, p. 495–498, 2009.

HIGES, M. *et al.* How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 10, p. 2659–2669, 2008.

HIGES, M. *et al.* *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, n. 1, p. 17–29, 2013.

HUANG, C. Y. *et al.* Growth stimulating effect on queen bee larvae of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 24, p. 6139–6149, 2012.

HUANG, Z. Y.; OTIS, G. W.; TEAL, P. E. A. Nature of Brood Signal Activating the Protein-Synthesis of Hypopharyngeal Gland in Honey Bees, *Apis-Mellifera* (Apidae, Hymenoptera). *Apidologie*, v. 20, n. 6, p. 455–464, 1989.

HULTBERG, M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 24, n. 1, p. 19–22, 2007.

HYVÖNEN; T. & SALONEN; J. Weed species diversity and community composition in cropping practices at two intensity levels - a six-year experiment: Weed species diversity and community composition in

cropping practices at two intensity levels - a six-year experiment. - *Plant Ecol.* 1. *Plant Ecology*, v. 159, n. 1, p. 73–81., 2002.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização. p. 10, 2004. Disponível em: <[http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos aos ecossistemas_polinizadores_vera.pdf](http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf)>.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotrop.*, v. 10, n. 4, p. 59–62, 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. *As abelhas , os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro Resultados e Discussão.*

IRONSIDE, J. E. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, n. 1, p. 48, 2007. Disponível em: <<http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-7-48>>.

JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine. Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 20, n. 6, p. 1195–1198, 1972. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60184a057>>.

JENKS, M. A. *Plant Abiotic Stress Edited by.* [S.l.: s.n.], 2007. v. 43. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0014479706224906>.

JIA, Z.; MISRA, H. P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NF- κ B and caspase-3. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 42, n. 2, p. 288–298, 2007.

JOHNSON, A. S. D. *et al.* Phylogeny and Radiation of Pollination Systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v. 85, n. 3, p. 402–411, 1998.

JOHNSON, R. M. *et al.* Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, 2013.

JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology. *Annual Review of Entomology*, v. 60, n. 1, p. 415–434, 2015. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011613-162005>>.

JOHNSON, R. M. *et al.* Pesticides and honey bee toxicity ? USA.

Apidologie, v. 41, n. 3, p. 312–331, 12 maio 2010. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1051/apido/2010018>>.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*, v. 168, p. 163–170, 2017. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>>.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Seikagaku*, v. 84, n. 12, p. 994–1003, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/nature10093>>.

KARISE, R. *et al.* Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere*, v. 188, p. 389–396, 2017.

KEELING, P. J.; FAST, N. M. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 93–116, 2002. Disponível em:
<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>>.

KESAVACHANDRAN, C. *et al.* Possible mechanism of pesticide toxicity-related oxidative stress leading to airway narrowing. *Redox report : communications in free radical research*, v. 11, n. 4, p. 159–62, 2006. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33749016478&partnerID=tZOTx3y1%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984738>>.

KILJANEK, T. *et al.* Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry--Honeybee poisoning incidents. *Journal of chromatography. A*, v. 1435, p. 100–114, 2016.

KILJANEK, T. *et al.* Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. *Chemosphere*, v. 175, p. 36–44, 2017.

KLEE, J. *et al.* Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, n. 1, p. 1–10, 2007.

KLEIN, A.-M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, v. 274, n. 1608, p. 66, 95–96, 191, 2007. Disponível em:
<http://apps.webofknowledge.com.ezproxy.utlib.ee/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=U2UFmF9XkyIY5tat>

JCP&page=1&doc=1>.

KREMEN, C. Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits? *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 115–124.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 304, n. 3, p. 433–435, 2003.

KRUPKE, C. H. *et al.* Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, 2012.

KRUPKE, C. H.; LONG, E. Y. Intersections between neonicotinoid seed treatments and honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, v. 10, n. May, p. 8–13, 2015.

L'ARRIVEE, J. C. . Tolerance of Honey Bees to Nosema Disease. *Journal of invertebrate pathology*, v. 7, p. 408–413, 1965.

LAMBIN, M. *et al.* Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 48, n. 3, p. 129–134, 2001.

LARSSON, R. J. I. Identification of Microsporidian Genera (Protozoa, Microspora) - a Guide with Comments on the Taxonomy. *Archiv für Protistenkunde*, v. 136, n. 1, p. 1–37, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003936588800320>>.

LASS, A.; CRAILSHEIM, K. Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, v. 43, n. 4, p. 347–358, 1996.

LIAO, L.-H.; WU, W.-Y.; BERENBAUM, M. R. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 15924, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-15066-5>>.

LOBO, J. A.; KRIEGER, H. Maximum likelihood estimates of gene frequencies and racial admixture in *Apis mellifera* L. (Africanized honeybees). *Heredity*, v. 68, n. May 1991, p. 441–448, 1992.

LUGHADHA, E. N.; PROENCA, C. A Survey of the Reproductive Biology

of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 83, n. 4, p. 480–503, 1996.

LUO, L. *et al.* In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 52, n. 6, p. 410–417, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1293449>>.

MACEDO, Liliame Maria Fróes de. Efeitos do CO₂ sobre a senescência e ativação dos ovários de *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, SP. 2009.

MALASPINA, O.; MATHIAS DA SILVA-ZACARIN, E. C. Cell Markers for Ecotoxicological Studies in Target Organs of Bees. *Brazilian Journal of Morphological Science*, v. 23, p. 303–309, 2006.

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A. L. Comportamento de forrageamento de abelhas e outros insetos nas panículas da mangueira (*Mangifera indica* L.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, v. 31, n. 3, p. 335–341, 2009.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (Citrus Pollination in orange sweet crop (Citrus sinensis L . *Animal Science*, p. 237–242, 2003.

MAMMUCARI, C.; RIZZUTO, R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 131, n. 7–8, p. 536–543, 2010.

MARC, J. *et al.* Pesticide roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 15, n. 3, p. 326–331, 2002.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, v. 109, n. 3, p. 605–612, 2011.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 20, p. 6331–6338, 2007.

MATIN, G.; KARGAR, N.; BUYUKISIK, H. B. Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*,

v. 90, p. 331–335, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.035>>.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 100, n. 3, p. 185–188, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.001>>.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity.

Toxicology, v. 314, n. 2–3, p. 122–128, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>>.

MICHENER, C. D. *The bees of the world*. [S.l: s.n.], 2000. v. 85.

Disponível em: <http://books.google.com/books?id=bu_1gmY13FIC>.

MITCHELL, E. A. D. *et al.* A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, v. 358, n. 6359, 2017.

MORITZ, B.; CRAILSHEIM, K. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v. 33, n. 12, p. 923–931, 1987.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Culture*, v. 128, n. March 2000, p. 1–15, 2000. Disponível em:

<<http://www.beeculture.com/content/pollinationreprint07.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/480F22F5-2367-4853-AD20-88441298BE0B>>.

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.

MOUGA, D. M. D. D. S. *et al.* Bees and plants in a transition area between atlantic rain forest and araucaria forest in Southern Brazil. *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)*, v. 67, n. 3, p. 313–327, 2012.

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, 2010.

MULLIN, C. A. *et al.* Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. *Frontiers in Public Health*, v. 4, n. May, p. 1–8, 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpubh.2016.00092/abstract>>.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay.

Aquatic Toxicology, v. 35, n. 3–4, p. 197–210, 1996.

NAGATA, R. T. *et al.* Evaluation of Glyphosate Resistance in Transgenic Lettuce. v. 125, n. 6, p. 669–672, 2000.

NASCIMENTO, W. M.; BATISTA, E. A.; FREITAS, R. A. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p. 494–498, 2012.

NAUG, D.; GIBBS, A. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, v. 40, n. 6, p. 595–599, 2009. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1051/apido/2009039>>.

NUNES, S. P. O desenvolvimento da agricultura brasileira e mundial e a idéia de Desenvolvimento Rural. *Deser - Departamento de estudos Sócio-econômicos Rurais*, v. 157, p. 15p, 2007. Disponível em:
<<http://www.deser.org.br/documentos/doc/DesenvolvimentoRural.pdf>>.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. n. September, 1998. Disponível em:
<http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test_9789264070165-en>.

OEPP/EPPO. Environmental risk assessment scheme for plant protection products Chapter 10: Honeybees. *Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes*, v. 10, p. 99–101, 2003.

ORANTES-BERMEJO, F. J. *et al.* Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, v. 49, n. 3, p. 243–250, 2010. Disponível em:
<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3896/IBRA.1.49.3.03>>.

OTHMAN, N. H. Honey and cancer: Sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, n. Figure 2, 2012.

PACÍFICO DA SILVA, I. *et al.* Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie*, v. 46, n. 6, p. 703–715, 2015.

PAPAEFTHIMIOU, C. *et al.* The action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibia. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 11, n. 2, p. 127–140, 2002.

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Índices nutricionais para medir-consumo e utilizacao de alimentos por insetos. *Bioecologia e*

nutrição de insetos - Base para o manejo integrado de pragas. Brasília - DF: [s.n.], 2009. p. 37–90.

PARRÓN, T. *et al.* Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 256, n. 3, p. 379–385, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.006>>.

PASCOAL, A. *et al.* Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 233–239, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>>.

PAXTON, R. J. *et al.* *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, v. 38, n. 6, p. 558–565, 2007. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/catalog/original-article-nosema-ceranae-infected-apis-mellifera-europe-since-least-1998-more-virulent-nosema/>5Cnhttp://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=doi&doi=10.1051/apido:2007037>.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005.

PEPE, I. M.; CUGNOLI, C. Isolation and characterization of a water-soluble photopigment from honeybee, *Apis mellifera*, compound eye. *Vision Res*, v. 20, n. 2, p. 97–102, 1980.

PEREIRA, É. *et al.* *Bibliografia brasileira de polinização e polinizadores*. [S.l: s.n.], 2006. v. 88. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047868>5Cn<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Bot?nica+Organografia#0%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161>5Cn<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991>5Cn<http://ww>>.

PEREIRA, F. DE M. Alternativas de Alimentação para Abelhas. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18.*; *CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 4., 2010, Cuiabá. Resumos... Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura*, n. 86, 2010.

PÉREZ, F. *et al.* Ancestral reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, v. 93, n. 7, p. 1029–1038, 2006.

PERNAL, S. F.; CURRIE, R. W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, v.

31, n. 3, p. 387–409, 2000. Disponível em:

<<http://www.edpsciences.org/10.1051/apido:2000130>>.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, v. 156, n. 1, p. 61–66, 2008.

PETTIS, J. S. *et al.* Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.

PHAM-DELÈGUE, M.-H. *et al.* Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, v. 33, p. 425–432, 2002.

Disponível em: <[http://www.mendeley.com/catalog/original-article-nosema-ceranae-infected-apis-mellifera-europe-since-least-1998-more-virulent-](http://www.mendeley.com/catalog/original-article-nosema-ceranae-infected-apis-mellifera-europe-since-least-1998-more-virulent-nosema/)

http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=doi&doi=10.1051/apido:2007037>.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; PENA, P. G. L. O agronegócio e seus impactos na saúde dos trabalhadores e da população do estado de Mato Grosso. p. 245–272, 2011. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=638203&indexSearch=ID>>. Acesso em: 21 maio 2017.

POLATTO, L. P. *et al.* Exploitation of floral resources on *Sparattosperma leucanthum* (Bignoniaceae): Foraging activity of the pollinators and the nectar and pollen thieves. *Acta Ethologica*, v. 15, n. 1, p. 119–126, 2012.

PORRINI, M. P. *et al.* *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*, v. 50, n. 1, p. 35–41, 2011. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3896/IBRA.1.50.1.04>>.

PROENÇA, C.; GIBBS, A. Reproductive Biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brasil. *New Phytol*, v. 124, n. 2, p. 343–354, 1994.

RAMIREZ-ROMERO, R. *et al.* Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 70, n. 2, p. 327–333, 2008.

REMBOLD, M. V. H. Die Kastenentstehung bei der Honigbiene, *Apis mellifica* L. *DIE NATURWISSENSCHAFTEN*, v. 3, p. 1–6, 1964.

Disponível em: <<papers3://publication/uuid/2883FEA0-8A5B-43D5-9AF2-368DC1C893FE>>.

- 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.
- RICHARD, S. *et al.* Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 6, p. 716–720, 2005.
- ROBINSON, G. E. *et al.* Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid haemolymph titres in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, v. 37, n. 12, p. 929–935, 1991.
- ROMA, G. C.; MATHIAS, M. I. C.; BUENO, O. C. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*, v. 37, n. 3, p. 234–242, 2006.
- ROMANO, R. M. *et al.* Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology*, v. 84, n. 4, p. 309–317, 2010.
- RONDEAU, G. *et al.* Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Scientific Reports*, v. 4, p. 1–8, 2014.
- ROUBIK, D. W. *Ecology and natural of tropical bees*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. Disponível em: <<http://www.cambridge.org/catalogue/catalogue.asp?isbn=9780521429092>>. Acesso em: 20 maio 2017.
- ROUBIK, D. W. *Feral African Bees Augment Neotropical Coffee Yield*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002. v. 53.
- RUBIO, F.; GUO, E.; KAMP, L. Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, v. 05, n. 01, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://omicsonline.org/open-access/survey-of-glyphosate-residues-in-honey-corn-and-soy-products-2161-0525.1000249.php?aid=36354>>.
- RUNDLÖF, M. *et al.* Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, v. 521, n. 7550, p. 77–80, 2015.
- SACKTOR, B. Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanisms in insect flight muscle. *Advances in Insect Physiology*, v. 7, p. 267–347, 1970.
- SAGILI, R. R.; PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v. 51, n. 9, p. 953–957, 2005.

SÁNCHEZ-BAYO, F. *et al.* Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International*, v. 89–90, p. 7–11, 2016a.

SÁNCHEZ-BAYO, F. *et al.* Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International*. [S.l: s.n.], 2016b

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

SANCHÍS, J. *et al.* Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 7, p. 2335–2345, 2012.

SANDROCK, C. *et al.* Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. 1–13, 2014.

SANTOS FILHO, E. *et al.* Grau de exposição a praguicidas organoclorados em moradores de aterro a céu aberto. *Revista de Saude Publica*, v. 37, n. 4, p. 515–522, 2003.

SCARSELLI, R. *et al.* Towards royal jelly proteome. p. 769–776, 2005.

SCHMARANZER, S. Thermoregulation of water collecting honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, v. 46, n. 8, p. 1187–1194, 2000.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 11, n. 4, p. 287–293, 1982.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A R.; ALMEIDA, E. A B. *ABELHAS BRASILEIRAS Sistemática e Identificação*. 1ª ed. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002.

SIMPSON, J.; RIEDEL, I. B. M.; WILDING, N. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *J. Apic. Res.*, v. 7, n. 1, p. 29–36, 1968.

SMODIS-SKERL, 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.

SMODIŠ ŠKERL, M. I.; GREGORC, A. Characteristics of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera carnica*) from a nurse colony.

Slovenian Veterinary Research, v. 52, n. 2, p. 67–74, 2015.

SPADOTTO, C. A. *et al.* Monitoramento do risco ambiental do agrotóxicos: princípios e recomendações. *Embrapa Meio Ambiente*, v. 42, p. 29, 2004.

SPURGEON, D. *et al.* Chronic oral lethal and sub-lethal toxicities of different binary mixtures of pesticides and contaminants in bees (*Apis mellifera* , *Osmia bicornis* and *Bombus terrestris*) Centre for Ecology & Hydrology. n. February, 2016.

SRIBANDITMONGKOL, P. *et al.* Pathological and Toxicological Findings in Glyphosate-Surfactant Herbicide Fatality. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v. 33, n. 3, p. 234–237, 2012.

STAHLMAN, P. W.; PHILLIPS, W. M. Weed Science Society of America Effects of Water Quality and Spray Volume on Glyphosate Phytotoxicity Effects of Water Quality and Spray Volume on Glyphosate Phytotoxicity1. v. 27, n. 1, p. 38–41, 1979.

SUWANNAPONG, G.; CHAIWONGWATTANAKUL, S.; BENBOW, M. E. Histochemical comparison of the hypopharyngeal gland in *Apis cerana fabricius*, 1793 workers and *Apis mellifera linnaeus*, 1758 workers. *Psyche*, v. 2010, p. 1–8, 2010.

TAKENAKA, T. *et al.* Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconico acid formation in the hypopharyngeal glands during the lifespan of the honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, n. 8, p. 2133–2134, 1990.

TAPPARO, A. *et al.* Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 5, p. 2592–2599, 2012.

TEIXEIRA, E. W. *et al.* *Epidemiologia da Nosemose em Abelhas Africanizadas (Apis mellifera L.) na região de Pindamonhangaba, SP. Boletim da Indústria animal.* [S.l: s.n.]. , 1997

THEODORAKIS, C. W.; SHUGART, L. R. Genetic ecotoxicology III: The relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology*, v. 7, n. 4, p. 227–236, 1998.

THOMPSON, H. M. *et al.* Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 10, n. 3, p. 463–470, 2014.

TOLEDO, V. A. A. *et al.* Polinização por Abelhas (*Apis mellifera* L.) em

Laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 12, n. 4, p. 236–246, 2013. Disponível em:

<<http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/1109-sap/v12n04/10681-polinizacao-por-abelhas-apis-mellifera-l-em-laranjeira-citrus-sinensis-l-osbeck.html>>.

TOPE, A.; BEBE, F. N.; PANEMANGALORE, M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, v. 41, n. 6, p. 843–53, 2006. Disponível em:

<<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33747168878&partnerID=tZOtx3y1>>.

TOSI, S. *et al.* A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. *Science of the Total Environment*, v. 615, p. 208–218, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.226>>.

TRAYNOR, K. S. *et al.* In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Scientific Reports*, 2016.

TSVETKOV, N. *et al.* Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, v. 1397, n. June, p. 1395–1397, 2017.

WALSH, L. P. *et al.* Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.

WANG, D.-I.; MOFLER, F. E. The division of labor and queen attendance behavior of *Nosema*-infected worker honey bees. *Journal of Economic Entomology*, v. 63, n. 5, p. 1539–1541, 1970. Disponível em: <<http://jee.oxfordjournals.org/content/63/5/1539.abstract>>.

WEHLING, M. *et al.* Colony losses - interactions of plant protection products and other factors. *Julius-kühn-archiv*, n. 423, p. 153–154, 2009.

WESSLER, I. *et al.* Honeybees produce millimolar concentrations of non-neuronal acetylcholine for breeding: Possible adverse effects of neonicotinoids. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, 2016.

WHITAKER, J.; SZALANSKI, A. L.; KENCE, M. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie*, v. 42, n. 2, p. 174–180, 2011. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1051/apido/2010045>>.

WHITEHORN, P. R. *et al.* Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science*, v. 336, n. 6079, p. 351–352, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1215025>>.

WIEST, L. *et al.* Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 34, p. 5743–5756, 2011.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>>.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 31, n. 2, p. 117–165, 2000. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230099913715>>.

WILLIAMS, G. R. *et al.* Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports*, v. 5, p. 14621, 2015. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/srep14621>>.

WOODCOCK, B. A. *et al.* Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, v. 356, n. 6345, p. 1393–1395, 2017. Disponível em:

<<http://science.sciencemag.org/content/356/6345/1393.full>>.

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. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 109, n. 3, p. 326–329, 2012.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. DE C. E. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: efeitos secundários e implicações fisiológicas e agrônômicas. *Potafos*, n. 19, p. 45, 2007. Disponível em:

<[http://www.ipni.org.br/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/425d07bd384d51950325704a004dbe75/\\$FILE/Anais Yamada e Paulo Castro.pdf](http://www.ipni.org.br/ppiweb/pbrazil.nsf/926048f0196c9d4285256983005c64de/425d07bd384d51950325704a004dbe75/$FILE/Anais Yamada e Paulo Castro.pdf)>.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean: A Minireview. v. 831, n. May 2003, p. 825–831, 2004.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. DE O. 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. 15217, 2017. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41598-017-15581-5>>.

ZEN, D.; ACRA, L. Biologia floral e reprodutiva de *Agapanthus africanus* (L.) Hoffmanns (Liliaceae). *Estudos de Biologia*, 2005. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/BS?dd1=16&dd99=pdf>>. Acesso em: 20 maio 2017.

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, 2014.

ZHU, Y. C. *et al.* Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). p. 1–16, 2017.