

# GLIFOSATO PROMOVE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM ABELHAS *Apis mellifera* LEPELETIER

Data de submissão: 30/12/2022

Data de aceite: 01/03/2023

### **Hadja Lorena Rangel Uchôa Cavalcanti de Menezes Costa**

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia Recife, Pernambuco  
<https://orcid.org/0000-0002-1952-5187>

### **Hilton Nobre da Costa**

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Recife, Pernambuco  
<https://orcid.org/0000-0002-3485-3162>

### **Júlio César dos Santos Nascimento**

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia Recife, Pernambuco  
<https://orcid.org/0000-0003-3107-5876>

### **Renata Valéria Regis de Sousa Gomes**

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia Recife, Pernambuco  
<https://orcid.org/0000-0002-2357-9989>

estas são responsáveis por um terço da polinização dos vegetais cultivados no mundo. A investigação visou as alterações comportamentais e bioquímicas resultantes da exposição das abelhas africanizadas à ingestão do ingrediente ativo glifosato. A investigação foi conduzida no Laboratório de Genética Animal e Melhoramento de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DZ/UFRPE), e foi dividida em duas fases: 1 - Bioensaio preliminar com tempo de exposição de 6 h; e 2 - Bioensaio com 24h de exposição. As experiências foram realizadas em triplicata, utilizando 90 abelhas operárias nas duas fases. Durante a execução dos experimentos, as abelhas foram mantidas num ambiente climatizado com uma temperatura média de  $23,9 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  e umidade de 50%, distribuídas em três tratamentos, formando os seguintes grupos: T1 (controle) - 1:1 60-g de sacarose e 60 mL de água destilada, T2 (960- $\mu\text{L}$  glifosato) e T3 (1. 920- $\mu\text{L}$  glifosato) adicionados ao xarope de 120 mL (1:1 60-g de sacarose e 60 mL de água destilada). O comportamento das abelhas foi observado a cada 30 minutos. As análises bioquímicas foram lípidos, açúcar total, glicogênio e proteínas. Foram observadas alterações no comportamento

**RESUMO:** O uso de pesticidas, como o glifosato, para o manejo de pragas e ervas daninhas vem aumentando. Isto tem tido um impacto nos polinizadores, especialmente nas abelhas, uma vez que

das abelhas após 2h de exposição, com tratamentos T2 e T3 mostrando desorientação e letargia, estatisticamente diferentes de T1. As primeiras mortes ocorreram nos tratamentos T2 e T3, nas primeiras 6h da experiência. Observou-se uma redução nos valores de glicogênio e açúcar total nos tratamentos com inclusão de glifosato, o que difere significativamente do controle. Os valores das proteínas e dos lípidos não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Concluiu-se que a ingestão de glifosato provoca alterações comportamentais e bioquímicas nas abelhas melíferas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Abelhas desorientadas, agrotóxico, herbicida, moléculas nutricionais, nutrição.

## GLYPHOSATE PROMOTES BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN *Apis mellifera* LEPELETIER BEES

**ABSTRACT:** The use of pesticides, such as glyphosate, for pest and weed management is increasing. This has had an impact on pollinators, especially bees, since they are responsible for a third of the pollination of the world's cultivated vegetables. The research aimed at the behavioral and biochemical changes resulting from the ingestion exposure of Africanized honey bees to the active ingredient glyphosate. The research was conducted in the Laboratory of Animal Genetics and Bee Improvement of the Department of Animal Husbandry, Federal Rural University of Pernambuco (DZ/UFRPE), and was divided into two stages: 1 - Preliminary bioassay with exposure time of 6 h; and 2 - Bioassay with 24 h of exposure. The experiments were performed in triplicate, using 90 worker bees in the two stages. During the execution of the experiments, the bees were kept in a climate-controlled environment with a mean temperature of  $23.9 \pm 0.8^\circ\text{C}$  and humidity of 50%, distributed in three treatments, forming the following groups: T1 (control) - 1:1 60-g sucrose and 60 mL of distilled water, T2 (960- $\mu\text{L}$  glyphosate) and T3 (1. 920- $\mu\text{L}$  glyphosate) added to 120-mL syrup (1:1 60-g sucrose and 60 mL of distilled water). The behavior of the bees was observed every 30 min. Biochemical analyses were lipids, total sugar, glycogen and protein. Changes in bee behavior were observed after 2h of exposure, with treatments T2 and T3 showing disorientation and lethargy, statistically different from T1. The first deaths occurred in treatments T2 and T3 in the first 6 h of the experiment. We observed a reduction in glycogen and total sugar values in the treatments with glyphosate inclusion, differing significantly from the control. The values of proteins and lipids showed no statistically significant difference. It was concluded that the ingestion of glyphosate causes behavioral changes and biochemical in honey bees.

**KEY-WORDS:** Disoriented bees, agrochemical, herbicide, nutritional molecules, nutrition.

## 1 | INTRODUÇÃO

As abelhas são responsáveis por cerca de um terço da produção mundial de alimentos, sendo consideradas, entre os polinizadores, os mais importantes (FAO, 2022). Em sistemas agrícolas, esses insetos estão intimamente ligados na polinização de muitas espécies cultiváveis e, conseqüentemente, mais suscetíveis à contaminação por pesticidas comumente usados nas lavouras. Entre todas as espécies de abelhas afetadas pela exposição, a *Apis mellifera* Lapeletier, também conhecida como africanizada, se destaca,

pois possui perfil generalista na busca de recursos (MOUGA, 2005).

Por ser um importante polinizador em ambientes não perturbados, essa espécie se tornou um modelo experimental na avaliação de impacto ambiental de pesticidas. Os problemas do uso de agroquímicos estão amplamente divulgados, e são comprovados ter efeitos adversos no comportamento (BALBUENA *et al.*, 2015, FARINA *et al.*, 2019, DELKASH-ROUDSARI, 2020), imunidade e microbiota intestinal (CASTELLI *et al.*, 2021), reprodução (HOOPMAN *et al.*, 2018), desenvolvimento (WU *et al.*, 2011), dentre outros.

Entre os pesticidas, o glifosato é o mais usado no mundo e prevalece nos principais produtos utilizados em monoculturas como o milho, soja e cana-de-açúcar (PIGNATI *et al.*, 2017). Apesar de ser reconhecido como um produto de baixa toxicidade, há evidências de impacto pela sua utilização no meio ambiente (GOMES, 2017). Sendo assim, a presente pesquisa avaliou os efeitos promovidos pela ingestão do herbicida glifosato no comportamento de desorientação, letargia e morte, como também no perfil de bioquímico de moléculas como proteínas, lipídios, glicogênio e açúcar em abelhas operárias *A. mellifera*.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Genética Animal e Melhoramento de Abelhas do Departamento de Zootecnia (DZ) e no Laboratório de Fisiologia de Insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Brasil).

### 2.1 Coleta das abelhas

As abelhas operárias foram coletadas do apiário experimental do DZ da UFRPE em recipientes plásticos e transferidas para as gaiolas de observação no Laboratório de Genética Animal e Melhoramento de Abelhas.

### 2.2 Bioensaios

A metodologia utilizada foi de Costa *et al.* (2013) com adaptações. Durante a montagem dos bioensaios, as abelhas foram mantidas em ambiente climatizado com temperatura média de  $23,9 \pm 0,8$  °C e umidade de 50%. A contaminação foi via ingestão. Os insetos foram transferidos para um tubo de Policloreto de vinila (PVC) de 15 cm de diâmetro por 10 cm de altura, apoiados sob um prato Vasart para vaso redondo e tampados com tecido tipo *voil*. No interior dos tubos PVC, foi oferecido xarope em uma placa de Petri de 90x15mm forradas com tela de Nylon, perfazendo os seguintes grupos: T1 (Controle) 1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada; T2: 960 µL de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada); e T3: 1.920 µL de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada). O tempo de exposição foi de 6 horas e 24 horas, perfazendo as etapas 1 e 2, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando a utilização de 90 abelhas

operárias.

### 2.3 Pesticida comercial

O produto comercial utilizado foi o herbicida Roundup® (445 g/L i.a. glifosato, Monsanto do Brasil LTDA – São Paulo/SP). Foi utilizada a menor dose de rotulagem indicada pelo fabricante, onde para cada 100 mL de xarope utilizou-se 1.600 µL do produto, sendo o T2 50% da dose mínima recomendada e o T3 100% da dose. As abelhas permaneceram com recipiente de água nas gaiolas durante a primeira hora e meia do experimento, após esse período a água foi retirada.

### 2.4 Análises comportamentais

Os dados comportamentais foram registrados a cada 30 minutos. Os parâmetros avaliados foram: i) Abelhas ativas (abelhas com comportamento natural, se movendo rapidamente); ii) abelhas paradas (não apresentavam movimento por curtos períodos); iii) abelhas desorientadas (voavam em padrões anormais, confusa, caindo do topo frequentemente ou não conseguindo chegar ao topo da arena); iv) abelhas letárgicas (pouca movimentação que permaneciam paradas por longos períodos, e/ou com contrações involuntárias); v) abelhas ingerindo alimento (sobre a plataforma de alimentação); vi) abelhas mortas (nenhuma reação a estímulos, sem vida).

### 2.5 Ensaios Bioquímicos

Para extração e quantificação das proteínas solúveis totais, lipídeo, açúcar total e glicogênio, foi utilizada uma abelha em cada amostra para cada tratamento, sendo obtidas 5 repetições. O preparo das amostras (controle e tratamentos) se deu com abelhas imobilizadas a uma temperatura de 4° C e macerados em 1,0 µL do tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1 M). O macerado foi retirado com um pipetador automático e armazenado em um microtúbulo devidamente etiquetado. Todo procedimento foi efetuado em baixa temperatura para evitar a oxidação das amostras. Após esta etapa ocorreu o preparo das amostras e para isso cada grupo de amostras foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, foi separado 100 µL de cada amostra para análise das proteínas solúveis totais e 200 µL para as análises de lipídio, açúcar total e glicogênio.

### 2.6 Extração e quantificação de proteínas totais

As proteínas solúveis totais foram determinadas a partir do método de Bradford (1976). Os 100 µL de cada amostra de macerado foram transferidos para tubos de vidro de centrifugação, adicionando o corante Bradford (0,01% de Comissie Blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol) até alcançar o volume de 5 mL. Os tubos foram então homogeneizados em agitador tipo vórtex e em seguida permaneceram em repouso por 2 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura em espectrofotômetro UV visível/190-1000 nm

Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 595 nm. A unidade de leitura utilizada foi  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.7 Extração e quantificação de lipídios, glicogênio e açúcar

O conteúdo do lipídio, açúcar total e glicogênio foram avaliados utilizando o método de Van Handel (1985a, b), onde 200  $\mu\text{L}$  do macerado homogeneizado foi acrescido 200  $\mu\text{L}$  de sulfato de sódio e 800  $\mu\text{L}$  de metanol e clorofórmio (proporção 1:1) e depois centrifugado a 3000 rpm durante 3 minutos. O precipitado foi usado para a análise de glicogênio e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio onde foram separados os lipídios e o açúcares. Os lipídios foram analisados espectrofotometricamente usando o método de ácido fosfórico-vanilina, enquanto o açúcar total e glicogênio pelo método ácido sulfúrico-antrona. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV visível/190-1000nm Biospectro SP-220 em comprimento de onda de 625 nm. A unidade de leitura usada foi  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados comportamentais e das variáveis bioquímicas foram analisados por meio da estatística descritiva e da análise de variância, verificando-se a diferença mínima significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). A análise discriminante multivariada foi utilizada com o objetivo de discriminar e alocar os diferentes grupos de tratamentos. Os dados foram analisados pelo software estatístico R Core Team (2018).

# 3 | RESULTADOS

## 3.1 Etapa 1

No tempo de avaliação de 6 horas, observou-se comportamento de desorientação após 2 horas de exposição no tratamento T2 ( $4,53 \pm 4,25$ ) e T3 ( $3,46 \pm 4,53$ ) e comportamento letárgico após 2h30min, T2 ( $5,53 \pm 5,07$ ) e T3 ( $6,46 \pm 6,38$ ), apresentando estatisticamente diferenças significativas em relação ao tratamento T1 (controle), no qual as abelhas se mantiveram ativas durante todo o experimento (Tab. 1, Fig. 4).

	<b>Ativa</b>	<b>Desorientada</b>	<b>Letárgica</b>
<b>T1</b>	15,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00b	0,00 $\pm$ 0,00b
<b>T2</b>	4,92 $\pm$ 7,04b	4,53 $\pm$ 4,25a	5,53 $\pm$ 5,07a
<b>T3</b>	5,00 $\pm$ 7,07b	3,46 $\pm$ 4,53a	6,46 $\pm$ 6,38a

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão do comportamento das abelhas com 6 horas de exposição aos tratamentos: T1 (controle), T2 e T3.

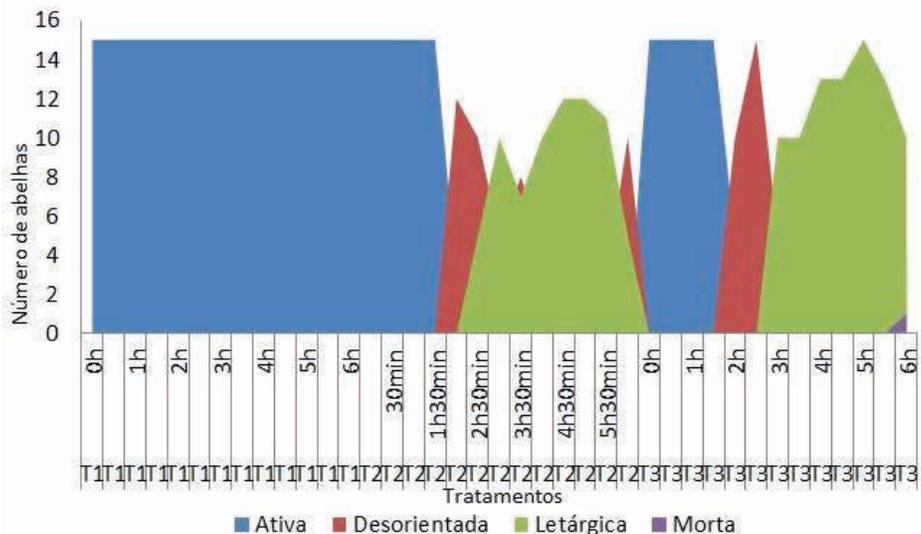


Figura 4 - Análise do comportamento das abelhas com 6 horas de exposição aos tratamentos: T1 (controle) - 1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada; T2: 960  $\mu$ L de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada); T3: 1.920  $\mu$ L de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada). Os dados comportamentais e das variáveis bioquímicas foram analisados por meio da estatística descritiva e da análise de variância, verificando-se a diferença mínima significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

### 3.2 Etapa 2

Avaliando-se os resultados quanto ao comportamento das abelhas, verificou-se que as primeiras mortes (Figura 5) foram nos tratamentos T2 e T3 nas 6 primeiras horas do início do experimento, com a taxa de mortalidade de 0,5% no T1, 1,2% no T2 e 2,7% no T3. Observa-se também uma maior frequência de abelhas ingerindo alimentos nos tratamentos T2 e T3 (Tabela 2).



Figura 5- A esquerda: abelha morta; No centro: abelhas sobre a plataforma de alimentação.

Horário	Ativa	Parada	Desorientada	Letárgica	Ing. Alim.	Morta
<b>T1</b>						
<b>0h-6h</b>	68	27	-	-	5	-
<b>6h-12h</b>	18,3	81,7	-	-	-	-
<b>12h-18h</b>	10	86,7	-	-	3,3	-
<b>18h-24h</b>	34,3	52	-	-	13,2	0,5
<b>T2</b>						
<b>0h-6h</b>	35	7,8	10	13,9	33,3	-
<b>6h-12h</b>	2,4	-	8,3	56,5	31,5	1,2
<b>12h-18h</b>		-	5,8	85,9	8,3	-
<b>18h-24h</b>	2,4	-	13	72,8	11,8	-
<b>T3</b>						
<b>0h-6h</b>	34,9	7,2	3,6	21,1	32,1	1,2
<b>6h-12h</b>	6,4	-	0,6	63,5	29,5	-
<b>12h-18h</b>	2,6	-	5,8	89,1	2,6	-
<b>18h-24h</b>	5,3	-	22,4	56,3	13,2	2,7

Tabela 2 - Frequência relativa média do comportamento das abelhas durante o período de 6, 12, 18 e 24 horas de exposição para ingestão dos tratamentos: T1 (controle), T2 e T3.

### 3.3 Bioquímica

Avaliando-se os resultados das análises bioquímicas verificou-se que houve diferença estatística significativa no perfil bioquímico do glicogênio, onde as médias dos tratamentos T2 e T3 foram inferiores ao tratamento controle T1 (Tabela 3). Na análise do açúcar verificou-se que o T1 foi superior e diferiu estatisticamente de T2 e T3, e T2 diferiu estatisticamente de T3. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

	Proteína	Glicogênio	Açúcar	Lipídio
T1	54.88±19.55a	1877.13±55.05a	1509.13±115.09a	19.57±15.29a
T2	75.62±22.48a	1666.75±100.80b	890.50±46.80b	54.14±38.89a
T3	75.03±5.74a	1649.38±104.69b	574.62±40.28c	58.71±46.67a

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 3 – Médias e desvio padrão do perfil bioquímico das abelhas por tratamento após 24 horas de ingestão.

Por meio da análise discriminante foi possível verificar a classificação e alocação dos grupos por tratamentos bem distintos (Figura 6). Em azul o T1, em vermelho o T2 e em verde o T3, todos eles bem agrupados de maneira distinta.

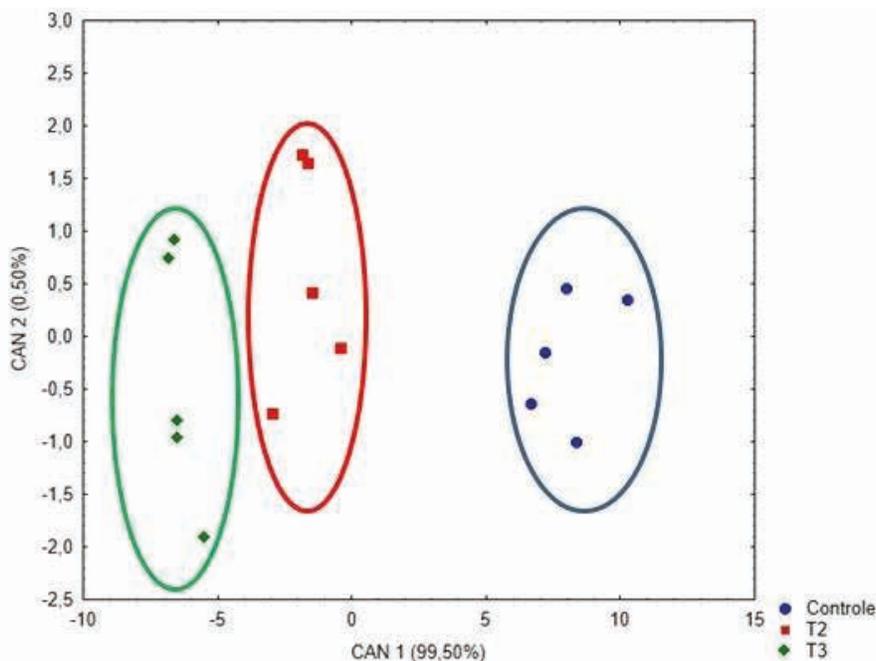


Figura 6 - Análise discriminante do perfil bioquímico dos tratamentos T1 (controle) - 1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada; T2: 960  $\mu$ L de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada); T3: 1.920  $\mu$ L de glifosato adicionado a 120 mL de xarope (1:1 60 g de sacarose e 60 mL de água destilada) com 24h de experimento.

## 4 | DISCUSSÃO

No Brasil é crescente a taxa de mortalidade em massa de abelhas, sendo que estudos vem demonstrando que essas ocorrências não estão associadas a patógenos ou a parasitas (PIRES et al., 2016). Uma das principais causas são em decorrência dos efeitos dos agrotóxicos. O Brasil lidera a lista global de perdas de abelhas na América do Sul, além disso, análises toxicológicas em amostras de abelhas vivas e mortas detectaram múltiplas contaminações por agrotóxicos (CASTILHOS *et al.*, 2019).

Além dos efeitos letais, os agrotóxicos também podem causar efeitos subletais, seja no comportamento, na fisiologia, bioquímica, imunidade, reprodução, dentre outros. Dentre todos esses produtos registrados, o glifosato se destaca por seu amplo espectro de ação e poder acumulativo e toxicológico em humanos e animais (BAI & OGBOURNE, 2016).

A desorientação e letargia, observadas neste estudo, aumenta a preocupação por esse herbicida ser amplamente utilizado no Brasil e seu princípio ativo está presente

na formulação de muitos outros herbicidas (IBAMA, 2019). O uso intensivo dessas substâncias sintéticas em áreas agrícolas, tem demonstrado alterações na atividade de voo das abelhas, e consequentemente diminuição potencial na capacidade dos serviços de polinização (KENNA *et al.*, 2019). Stanley e Raine (2016), sugerem que o comportamento de forrageamento em flores pode ser alterado pela exposição subletal a níveis de pesticidas em campo. Além do comportamento, a exposição a doses subletais também pode alterar a termorregulação, afetando a atividade de forrageamento e uma variedade de tarefas na colmeia, provavelmente levando a consequências negativas no nível da colônia (TOSI *et al.*, 2016). Assim, é evidente que isso tem implicações para o sucesso e a sobrevivência das colônias.

Os níveis reduzidos de glicogênio e açúcares totais demonstram efeitos bioquímicos. Mesmo não havendo diminuição de glicogênio diretamente proporcional ao aumento da dose de glifosato, o agrotóxico ocasiona alterações nos níveis dessa molécula. Já o açúcar total, diminuiu proporcionalmente ao aumento da dose. Provavelmente, existem lesões celulares importantes no trato intestinal devido a ingestão do pesticida, isso teria ocasionado um trade-off, ou seja, um desequilíbrio entre desintoxicação e reparação de células, culminando no desbalanço homeostático fisiológico e bioquímico (SILVA, 2017). Para conseguir reestabelecer a homeostase, o organismo dispense de energia que vem das reservas de glicogênio, que são quebradas em moléculas de glicose e/ou convertidas em trealose para alimentar os tecidos, levando assim a uma diminuição tanto nos níveis de glicogênio analisado quanto nos valores de açúcares totais.

Os resultados desta pesquisa são semelhantes ao encontrados na literatura. Nath (2003), avaliando o potencial tóxico de organofosforados de grau comercial no bicho-da-seda (*Bombyx mori*), registrou reduções significativas nas reservas de glicogênio no corpo gorduroso desses insetos. Costa *et al.* (2021), também observaram isso no besouro *Anthonomus grandis* exposto aos pitretroides lambda-cialotrina e beta-ciflutrina. Neste mesmo besouro exposto a pimetrozina, ocorreu depleção apenas nas taxas de glicogênio, pois o açúcar total aumentou (CUNHA *et al.* 2015).

O glicogênio e os açúcares totais fazem parte do grupo dos carboidratos (CHAPMAN, 1998), essa classe de biomoléculas, junto com a classe de lipídios, é uma das principais reservas energéticas presentes no organismo dos insetos. O glicogênio armazenado na musculatura alar é uma fonte imediata de energia, principalmente para atender as necessidades do voo. Já o armazenado no corpo gorduroso é convertido em trealose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), um dos principais açúcares presentes no corpo dos insetos, para liberação na hemolinfa afim de atender as necessidades do organismo (CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2007). Portanto, alterações nos níveis dessa molécula podem resultar em consequências drásticas para a sobrevivência das colônias. As taxas de proteínas e lipídios mantiveram-se inalteradas frente ao glifosato neste estudo, talvez porque o tempo de exposição não tenha sido suficiente. Além disso, se faz necessário investigar os danos celulares no intestino para

melhor compreensão destes efeitos, carecendo de pesquisas futuras mais aprofundadas.

Reduções de moléculas nutricionais podem ser um grande problema para o sucesso reprodutivo, pois a gametogênese e a formação de ovos demanda níveis adequados. Além disso, a imunidade e capacidade de desintoxicação de agrotóxicos depende também de taxas equilibradas dessas moléculas (KLOWDEN 2007, GULLAN & CRANSTON 2012, CHAPMAN 1998).

## 5 | CONCLUSÃO

A ingestão do glifosato, nas doses usadas e nos tempos avaliados, ocasiona alterações comportamentais e modificações nos parâmetros bioquímicos das abelhas africanizadas.

## REFERÊNCIAS

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. **Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination.** Environ Sci Pollut Res, oct 2016.

BALBUENA, M.S.; TISON, L.; HAHN, M.L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R; FARINA, W.M. **Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation.** Journal of Experimental Biology, 17: 2799-2805, 2015.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of dye-binding.** Anal. Biochem., v. 72, p. 248 – 254, 1976.

CASTELLI, L.; BALBUENA, S.; BRANCHICCELA, B.; ZUNINO, P.; LIBERTI, J.; ENGEL, P.; ANTÚNEZ, K. **Impact of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Glyphosate on Honey Bee Immunity, Gut Microbiota and Infection by Pathogens.** Microorganisms, doi: 10.3390/microorganisms9040845, 2021.

CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J. L. D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇAL-VES, L. S. **Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas.** Apidologie, v. 50, p. 657 – 668, 2019.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function.** 4. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, 1998. 788 p.

COSTA, E. M.; ARAÚJO, E. L.; MAIA, A. V. P.; SILVA, F. E. L.; BEZERRA, C. E. S.; SILVA, J. G. **Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions.** Apidologie, v. 45, p. 34 – 44, 2013.

COSTA, H.N., CRUZ, G.S., GUEDES, C.A., FERREIRA, M.C.N., BRAGA, V.A.A., DUTRA, K.A., MELO, I.M.F., ROLIM, G.G., ALBUQUERQUE, F.A., FILHO, L.D.V., TEIXEIRA, Á.A.C. & WANDERLEY-TEIXEIRA. **Lambda-cyhalothrin promotes oxidative stress and pathological changes in the midgut and gonads of cotton boll weevil.** Int J Biol Sci. 2: 1-17, 2022.

CUNHA, F. M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H.; TORRES, J. B.; GONÇALVES, G. G. A.; SANTOS, F. A. B. **Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae)**. *Animal Biology*, v. 65, p. 271 – 285, 2015.

DELKASH-ROUDSARI, S.; CHICAS-MOSIER, M.; GOLDANSAZ, S.H.; TALEBI-JAHROMI, K.; ASHOURI, A.; ABRAMSON, C.I. **Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.)**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204: 111108, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Pollination & human livelihoods**. Disponível em: <https://www.fao.org/pollination/background/en/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

FARINA, W.M.; BALBUENA, M.S.; HERBERT, L.T.; GOÑALONS, C.M.; VÁZQUEZ, D.E. **Effects of the Herbicide Glyphosate on Honey Bee Sensory and Cognitive Abilities: Individual Impairments with Implications for the Hive**. *Insects*, 10: 354. doi: 10.3390/insects10100354, 2019.

GOMES, I. N. **BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO INDICAM EFEITOS DELETÉRIOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS *Melipona capixaba* E *Apis mellifera***. 2017. 51 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Viçosa.

HANDEL, E. V. **Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes**. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 1, p. 299 – 301, 1985a.

HANDEL, E. V. **Rapid determination of total lipids in mosquitoes**. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 1, p. 302 – 304, 1985b.

HOOPMAN, A.; NORTH, H.; RAJAMOCHAN, A.; BOWSHER, J. **Toxicity assessment of glyphosate on honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa**.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=594&Itemid=5](https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=5) 4. Acesso em: 5 dez 2019.

KENNA, D.; COOLEY, H.; PRETELLI, I.; RODRIGUES, A. R.; GILL, S. D.; GILL, R. J. **Pesticide exposure affects flight dynamics and reduces flight endurance in bumblebees**. *Ecology and Evolution*, 9:5637–5650, 2019.

KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2007.

MOUGA, D. M. D. S.; NOGUEIRA-NETO, P. **As comunidades de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em Mata Atlântica na região nordeste do Estado de Santa Catarina, Brasil (2005)**. 2005. 171 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo.

NATH, B. S. **Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity**. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 74, p. 73 – 84, 2003.

NATH, B. S.; SURESH, A.; VARMA, B. M.; KUMAR, R. P. S. **Changes in Protein Metabolism in Hemolymph and Fat Body of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in Response to Organophosphorus Insecticides Toxicity**. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, v. 36, p. 169 – 173, 1997.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde**. Ciência & Saúde Coletiva, p. 3281 – 3293, 2017.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. **Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 51, n. 5, p. 422 – 442, mai. 2016.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

SILVA, P. R. **Influência dos herbicidas Sulfentrazone (Boral®500 SC) e Glifosato (Roundup® Original) na composição bioquímica e nas defesas antioxidantes de *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae)**. 2017. 73 p. Dissertação (Mestrado) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

STANLEY, D. A.; RAINE, N. E. **Chronic exposure to a neonicotinoid pesticide alters the interactions between bumblebees and wild plants**. Functional Ecology, 2016.

TOSI, S.; DÉMARES, F. J.; NICOLSON, S. W.; MEDRZYCKI, P.; PIRK, C. W. W.; HUMAN, H. **Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera scutellata*)**. Journal of Insect Physiology, 93: 56-63, 2016.

WU, J.Y.; ANELLI, C.M.; SHEPPARD, W.S. **Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity**. Plos One, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>, 2011.