



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCAS BATTISTI

**TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO PARA AS  
ABELHAS**

---

Londrina  
2021

LUCAS BATTISTI

**TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO PARA AS  
ABELHAS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia  
Coorientadora: Profa. Dra. Michele Potrich

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B336      Battisti, Lucas.  
            Toxicidade do herbicida glifosato para as abelhas / Lucas Battisti. - Londrina, 2021.  
            167 f.

            Orientador: Silvia Helena Sofia.  
            Coorientador: Michele Protrich.  
            Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.  
            Inclui bibliografia.

            1. Toxicidade do herbicida glifosato para as abelhas - Tese. I. Sofia, Silvia Helena. II. Protrich, Michele. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

LUCAS BATTISTI

## **TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO PARA AS ABELHAS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Claudia Bueno Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Everton Ricardo Lozano da Silva  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

---

Profa. Dra. Márcia Regina Faita  
Universidade Federal de Santa Catarina -  
UFSC

---

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Londrina, 18 de novembro de 2021

Dedico esse trabalho a Deus, minha família e professores, por me proporcionarem conhecimento e condições para realizá-lo.

## **AGRADECIMENTOS**

Com toda certeza os parágrafos que irei descrever aqui não atenderão a todos que foram importantes nesta fase da minha vida. Portanto, peço desculpas antecipadamente aos que não foram citados, mas certamente fazem parte da minha gratidão.

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder forças todos os dias, e me fornecer sabedoria nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, que me aceitou me orientar, oportunizando meu ingresso no doutorado, além de compartilhar comigo todo seu conhecimento ao longo desses anos, me fazendo crescer como biólogo e professor, muito obrigado.

A Profa. Dra. Michele Protrich por aceitar ser minha coorientadora. Sem você certamente terminar meu doutorado não seria possível. Você me acolheu, como em tantas outras vezes, me ensinando muitas coisas que irei levar para o resto da vida, muito obrigado.

A Profa. Dra. Claudia B. R. Martinez por todos os momentos que me auxiliou, me orientando e me ensinando inúmeras coisas que irei levar para toda a vida.

A Profa. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi por me auxiliar durante o capítulo 2 (meta-análise). Esse auxílio foi muito importante para o meu doutorado, e o que aprendi certamente levarei sempre comigo.

A Profa. Dra. Fabiana Martins Costa-Maia por disponibilizar o apiário para coleta das abelhas e montagem dos meus experimentos. Além do mais, ajudando no desenvolvimento da meta-análise, orientações de extrema importância.

A minha família e namorada por me darem forças e apoio nos momentos difíceis e alegres, sei que sem tal apoio nunca teria conseguido.

As minhas amigas e colegas Gabriela Libardoni, Raiza Abati e Amanda Roberta Sampaio. Só tenho a agradecer. Sem a ajuda dessas pessoas, com certeza não conseguiria ter finalizado o trabalho. E, aos meus colegas de Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-FV (LABCON) que sempre foram muito dispostos a me auxiliar.

A Coordenação, Secretaria e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Laboratório de Controle Biológico (LABCON) pela parceria e desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro (PROAP) e CNPq, A.B.E.L.H.A., IBAMA/MMA e MCTIC pelo financiamento de parte deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora que aceitaram o convite para participarem da minha defesa de doutorado.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

*“A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência” - Charles Darwin.*

BATTISTI, Lucas. **Toxicidade do herbicida glifosato para as abelhas**. 2021. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A redução da diversidade das abelhas tem sido relacionada ao uso excessivo de agrotóxicos. Nesse contexto, a preocupação relacionada aos produtos à base do herbicida glifosato (GLY) tem aumentado, pois são os agrotóxicos mais vendidos no mundo, e pesquisas estão demonstrando que tais produtos podem causar efeitos letais e subletais nas abelhas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do herbicida glifosato e seus diferentes formulados comerciais para as abelhas. Para tal, três trabalhos foram desenvolvidos, sendo eles (1) Efeitos subletais do GLY puro ou formulado em abelhas: Uma breve revisão; (2) O GLY é tóxico para as abelhas? Uma revisão meta-analítica; (3) Toxicidade do herbicida GLY formulado para *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) africanizada. Para o desenvolvimento dos trabalhos 1 e 2, uma busca criteriosa foi realizada nos indexadores “Web of Science”, Periódicos CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil), Scopus e PubMed e Google Scholar. Os scripts booleanos utilizados foram “Glyphosate” AND “bees” (trabalho 1) e “Glyphosate” AND “bees” AND (“mortality” OR “selectivity” OR “longevity” OR “toxicity” OR “survival”) (trabalho 2), a fim de selecionar os artigos que avaliaram efeitos letais e subletais causados pelo GLY (puro ou formulado) em abelhas, publicados até setembro de 2021. Dos artigos encontrados na pesquisa, 33 foram selecionados para o “trabalho 1” e 16 para o “trabalho 2”. A partir da meta-análise e da breve revisão, foi possível constatar que o GLY tem potencial para causar a mortalidade de várias espécies de abelhas ou causar danos moleculares, celulares, histológicos e sistêmicos. Já no “trabalho 3”, realizou-se bioensaios em laboratório para avaliar os efeitos tóxicos do Roundup Transorb R® (RT) para *A. mellifera* africanizada. Dois bioensaios foram realizados, um para exposição aguda por via oral e tópica (avaliando-se a mortalidade, locomoção, deslocamento vertical, retomada de voo) e outro para exposição crônica oral e tópica (avaliando-se a mortalidade e danos no epitélio do intestino médio). O RT pode causar mortalidade e danificar a espessura do epitélio do intestino médio (exposição crônica por via oral) e reduzir a locomoção (exposição aguda por via oral). Os resultados desta tese contêm informações importantes sobre o efeito do GLY, puro e formulado em abelhas, contudo, considerando-se a extensa gama das formulações comerciais do GLY, destaca-se a necessidade de novas pesquisas que avaliem os efeitos letais e subletais deste herbicida, principalmente formulado, sobre este importante grupo de polinizadores.

**Palavras-chave:** *apis mellifera* africanizada; efeitos letais; efeitos subletais; exposição aguda; exposição crônica; meta-análise; roundup transorb R.

BATTISTI, Lucas. **Toxicity of glyphosate herbicide to bees**. 2021. 167 p. Thesis (Doctorate in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The reduction in bee diversity has been related to the excessive use of pesticides. In this context, the concern related to products based on glyphosate (GLY) has increased, as they are the most sold pesticides in the world, and research has shown that such products can cause lethal and sub-lethal effects on bees. Therefore, the objective of this work was to evaluate the toxicity of the herbicide glyphosate to bees. To this end, three works were developed, namely (1) Sublethal effects of pure or formulated glyphosate in bees: A brief review; (2) Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytic review; (3) Toxicity of the formulated glyphosate herbicide to Africanized *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). For the development of works 1 and 2, a careful search was carried out in the “Web of Science” indexers, CAPES Periodicals (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil), Scopus and PubMed and Google Scholar. The Boolean scripts used were "Glyphosate" AND "bees" (work 1) and "Glyphosate" AND "bees" AND ("mortality" OR "selectivity" OR "longevity" OR "toxicity" OR "survival") (work 2) , in order to select the articles that evaluated lethal and sublethal effects caused by GLY (pure or formulated) in bees, published until September 2021. Of the articles found in the research, 33 were selected for "work 1" and 16 for the “job 2”. From the meta-analysis and the brief review, it can be seen that GLY has the potential to cause the mortality of several species of bees or cause molecular, cellular, histological and systemic damage. In “work 3”, laboratory bioassays were carried out to assess the toxic effects of Roundup Transorb R<sup>®</sup> (RT) for Africanized *A. mellifera*. Two bioassays were performed, one for acute oral and topical exposure (assessing mortality, locomotion, vertical displacement, flight resumption) and another for chronic oral and topical exposure (assessing mortality and damage to the intestinal epithelium medium). RT can cause mortality and damage the thickness of the midgut epithelium (chronic oral exposure) and reduce locomotion (acute oral exposure). The results of this thesis contain important information about the effect of GLY and its formulas on bees, however, considering the wide range of commercial formulations of GLY, the need for further research to assess the lethal and sublethal effects of this herbicide is highlighted. , mainly formulated, about this important group of pollinators.

**Key-words:** acute exposure; africanized *apis mellifera*; chronic exposure; lethal effects; sublethal effects; metanalysis; roundup transorb R.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Artigos que avaliaram os efeitos subletais do GLY puro ou formulado em abelhas, publicados até setembro de 2021. A) Percentual de artigos que utilizaram *Apis* spp. e não *Apis* spp. como organismos modelo. (B) Percentual de investigações (experimentos) com os diferentes efeitos subletais avaliados nos 33 artigos publicados. (C) Número de artigos com o ciclo de vida (adultos e larvas), formas de exposição (ingestão e tópica), tempo de exposição (crônica e aguda) e forma de avaliação (letal ou subletal).....93
- Figura 2:** Linha do tempo com os artigos publicados e avaliados por pares, que investigaram os efeitos subletais do GLY, puro ou formulado, em abelhas solitárias e sociais, nas fases de larva/adulto. ....94
- Figura 3:** Possíveis biomarcadores associados a exposição crônica ou aguda de abelhas adultas ou larvas ao GLY e suas formulações. ....95

### CAPÍTULO 2

- Figure 1:** Papers identified and selected from the search carried out in the databases “Web of Science”, Periódicos Capes, Scopus, and PubMed, considering criteria of mortality of the bees. ....96
- Figure 2:** Papers that evaluated the effect of GLY on bee mortality / survival, organized by effect size. The numbers on the right side represent the mean mortality and the confidence interval (CI - 95%) for each experiment. The numbers on the left side represent each paper as shown in Table 1. The vertical lines represent each set of papers and the general polygon is the Grand mean summarizing the effects size of all studies. ....99
- Figure 3:** Forest plot with the categorization of results by dose (A), methodology (B), life stage (C), and species of bees (D). The mean mortality (effect size and lnR) and the confidence interval (CI - 95%) are shown on the right side of each graph. The grand mean is the overall effect size of all studies. “Study ID” represents the different categories analyzed.....100

**Figure 4:** Figure 4. Funnel plot for the association of bee mortality with GLY exposure. The X-axis represents the Log Odds Ratio and the Y – Axis represents the standard error. ....101

### CAPÍTULO 3

**Figura 1:** Porcentagem de sobrevivência de operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada, com base no estimador de Kaplan – Meier, ajustado ao período (h). (A) Exposição aguda por via oral; (B) Exposição aguda por via tópica; (C) Exposição crônica por via oral (linha tracejada indica as 96 h de exposição); (D) Exposição crônica por pulverização; As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os resultados ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada.....138

**Figura 2:** Deslocamento vertical e retomada de voo de operárias campeiras de *A. mellifera* (africanizada), expostas ao RT, por via oral (A e B) e por via tópica (C e D), após 48 h de experimento. Os quadrados representam os valores medianos dos estratos para cada tratamento com os respectivos primeiro e terceiro quartis. As mesmas letras (minúsculas) dentro das figuras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) para o teste de comparação de múltiplos de Tukey. Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada.....140

**Figura 3:** Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) ( $\pm$  SE) do epitélio do intestino médio de campeiras de *Apis mellifera* africanizadas após exposição crônica, por via alimentar, ao RT. Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada. As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos para o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....141

**Figura 4:** Fotomicrografia do epitélio intestinal (intestino médio) de *A. mellifera* africanizada do grupo controle e após exposição crônica (144 h) ao RT por via oral. EP – Epitélio do Intestino médio; CG – Célula Globular (Caliciforme); CC – Célula Colunar ou enterócito; CR – Célula Regenerativa; MC –Músculo Circular.....142

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1:</b> Efeitos subletais causados pela exposição das abelhas ao GLY puro ou formulações, espécies, estágio de vida, vias de exposição e tempo de exposição dos 33 artigos encontrados até setembro de 2021. ....	62
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1:</b> Data on bee mortality: identification number of each paper in the meta-analysis, reference citation, methodology used, bee species, stage of the life cycle and concentration/dose used. ....	97
<b>Table S1:</b> List of the 34 studies used in the meta-analysis, method of exposure, development stages (larvae and adult), species of bees, type and time (h) of exposure, concentration and dose used .....	75

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1:</b> Produto comercial, composição, dosagem, principais culturas para qual é recomendado e tratamentos utilizados. ....	132
<b>Tabela 2:</b> Níveis (estratos) para o teste de deslocamento vertical e queda livre (retomada de voo) de operárias campeiras de <i>A. mellifera</i> africanizada. ....	135
<b>Tabela 3:</b> Velocidade média das abelhas (mm/s), distância percorrida (mm), tempo (s) de caminhada e tempo (s) de descanso após a ingestão do GLY [ $\pm$ erro padrão (SE)]. Os tratamentos foram T1 - Controle; T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% – dose recomendada (Tabela 1). ....	139

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
RT	Roundup Transorb R®
ADAPAR	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Governo Federal)
LABCON	Laboratório de Controle Biológico
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development

## PREFÁCIO

É uma imensa satisfação poder finalizar o doutorado após quase quatro anos de muita dedicação. Quando terminei o mestrado, em julho de 2017, fiquei em dúvida se deveria seguir para o doutorado, pois já atuava como professor de biologia no ensino médio e cursinho pré-vestibular, o que dificultaria por causa do tempo. Mas, desde que entrei na graduação de biologia tive vontade de fazer doutorado na área de entomologia/biologia e meus orientadores Prof. Dr. Everton Lozano e Profa. Dra. Michele Potrich me incentivaram/ajudaram bastante, por isso sou eternamente grato a eles. Após procurar alguns programas de doutorado, encontrei o Doutorado em Ciências Biológicas da UEL, e com “a cara e a coragem” escrevi um e-mail para a profa. Dra. Silvia Helena Sofia me apresentando e comentando sobre meu interesse em cursar o programa a partir de 2018.

Realmente não sei qual foi a primeira impressão que a profa. Silvia teve de mim, mas recordo que em sua primeira resposta via e-mail, comentou que não tinha mais vagas disponíveis para o doutorado. No entanto, logo depois me retornou falando da possibilidade de trabalharmos juntos nos anos seguintes. Desde então, só tenho a agradecer a profa. Silvia pela oportunidade, além da ajuda nesses quatro anos de parceria, e dizer que tenho enorme admiração pela pessoa/profissional que conheci e tive o prazer de trabalhar junto. O projeto que escrevi para ingressar no programa foi sobre “seletividade de extratos vegetais ao parasitoides de ovos *Telenomus podis*”, entretanto, surgiu a oportunidade de fazermos uma pesquisa sobre a toxicidade do glifosato para abelhas, reatando a parceria com a profa. Michele (que sempre me ajudou e só tenho a agradecer), iniciando minha paixão por esses polinizadores.

No início o objetivo do projeto era avaliar a toxicidade do glifosato para *Apis mellifera* africanizada, usando o teste cometa para estimar danos no DNA nuclear destes animais. Entretanto, não conseguimos padronizar uma metodologia eficiente para este biomarcador nas abelhas. Assim, os experimentos se basearam em avaliar a mortalidade, locomoção, deslocamento vertical, retomada de voo e danos no epitélio intestinal. Em 2020 veio a pandemia da COVID-19, e isso dificultou bastante a parte experimental, pois uma das medidas de profilaxia da doença era o isolamento social. Em tal contexto, para aproveitar o tempo e trabalhar de forma remota, surgiu a ideia de desenvolvermos uma meta-análise e uma breve revisão sobre os efeitos letais e subletais do glifosato (puro ou formulado) em abelhas, respectivamente.

A partir da pesquisa na literatura vi a necessidade urgente de novas pesquisas que visam entender os efeitos do glifosato em abelhas, visto a importância ecológica e econômicas destes animais. Apesar de ser um herbicida, o glifosato tem potencial de causar a mortalidade ou prejudicar a saúde das abelhas, reduzindo o sucesso de polinização e pode agravar o declínio populacional das abelhas, e até mesmo contribuir para o distúrbio do colapso das colônias.

Um tio que mora na região metropolitana de Porto Alegre - RS, e faz parte da associação de apicultores da região, ficou muito interessado em saber como estava sendo realizada a minha pesquisa e quais seriam os resultados preliminares. Tal interesse estava relacionado com a diminuição das colmeias durante o período da produção de soja, comentando que a aplicação do glifosato era excessiva. Com isso, pensei na importância dos resultados deste projeto para a sociedade em geral, se fossem divulgados de forma correta, e isso fez com que eu me dedicasse ainda mais.

Espero que os resultados desta tese façam pesquisadores, profissionais da área agrícola, produtores agrícolas e sociedade em geral se conscientizarem do quanto os pesticidas podem ser prejudiciais ao meio ambiente quando aplicados de forma errada. O glifosato é o pesticida mais vendido no mundo, e sua utilização é feita de forma excessiva, aplicando-o na maioria das vezes em quantidade muito maior do que o necessário, mesmo tendo “fortes evidências” de que o glifosato pode contaminar a água e o solo, causando danos letais e subletais em diversas espécies de animais, inclusive nos seres humanos. Esta tese é dedicada a todos que desejam conhecer mais sobre toxicologia, especificamente dos efeitos do glifosato em abelhas, e poder se inteirar mais sobre esse assunto que é de extrema importância.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	62
1.1	ABELHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	62
1.2	POLINIZAÇÃO E A IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS.....	64
1.3	DECLÍNIO POLULACIONAL DAS ABELHAS .....	65
1.4	CULTURA DO CAFÉ E ABELHAS.....	68
1.5	AGROTÓXICOS E ABELHAS .....	70
1.6	REVISÕES SISTEMÁTICAS E META-ANÁLISE .....	72
1.7	REFERÊNCIAS.....	73
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	86
2.1	OBJETIVO GERAL.....	86
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	86
<b>3</b>	<b>Capítulo 1: EFEITOS SUBLETAS DO GLIFOSATO PURO OU FORMULADO EM ABELHAS: UMA BREVE REVISÃO</b> .....	87
3.1	INTRODUÇÃO .....	88
3.2	VIAS DE CONTAMINAÇÃO DAS ABELHAS PELO GLIFOSATO E SEUS FORMULADOS .....	92
3.3	EFEITOS SUBLETAS DO GLIFOSATO EM ABELHAS .....	92
3.3.1	Alterações moleculares: efeitos do GLY e seus formulados na expressão gênica e atividade enzimática .....	95
3.3.2	Efeitos tóxicos do GLY e seus formulados em nível celular .....	64
3.3.3	Alterações na microbiota intestinal .....	65
3.3.4	Alterações na aprendizagem e comportamento .....	67
3.3.5	Alterações no desenvolvimento.....	69
3.3.6	Alterações na imunidade das abelhas.....	70
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 2: IS GLYPHOSATE TOXIC TO BEES? A META- ANALYTICAL REVIEW</b> .....	87

5.1	INTRODUCTION.....	89
5.2	MATERIALS AND METHODS .....	91
5.2.1	Study development, data search and structuring.....	91
5.2.2	Data Analysis.....	93
5.3	RESULTS .....	95
5.3.1	Selection of items and data sets .....	95
5.3.3	Analysis of the lethal effects of glyphosate on bees .....	98
5.3.4	Categorization of Results.....	99
5.3.5	Publication Bias .....	101
5.4	DISCUSSION .....	102
5.5	CONCLUSION .....	108
5.6	REFERENCES.....	108

<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 3: TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO FORMULADO PARA <i>Apis mellifera</i> LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA.....</b>	<b>129</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	129
6.2	METODOLOGIA .....	132
6.2.1	Obtenção de <i>Apis mellifera</i> africanizada e Roundup Transorb R® (RT).. .....	132
6.2.2	Bioensaio de sobrevivência de <i>A. mellifera</i> exposta ao RT.....	133
6.2.3	Bioensaio de locomoção.....	135
6.2.4	Bioensaio de deslocamento vertical e retomada de voo .....	135
6.2.5	Histologia do intestino médio.....	136
6.2.6	Análise estatística.....	136
6.3	RESULTADOS.....	137
6.3.1	Bioensaio de sobrevivência (exposição aguda e crônica).....	137
6.3.2	Bioensaio de Locomoção (deslocamento caminhando) .....	139
6.3.3	Bioensaio de deslocamento vertical e retomada de voo.....	139
6.3.4	Histologia do intestino médio .....	140
6.4	DISCUSSÃO .....	142
6.5	CONCLUSÃO .....	146
6.6	REFERÊNCIAS .....	146

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	168
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	169
<b>9</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	171
9.1	APÊNDICE A – Fotos do Apiário localizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UNEPE – Apicultura). O apiário contém 52 colônias, cada uma formada pela caixa (cinco quadros) e sobrecaixa (cinco quadros) com aproximadamente 9 a 12 mil indivíduos. ....	171
9.2	APÊNDICE B – Fotos da montagem dos bioensaios no LABCON da UTFPR-DV. (A) Gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) cobertas com tecido Voil; (B) Sala climatizada (26 ° C ± 2 ° C, UR, 60% ± 10%, fotoperíodo de 12 h); (C, D e E) Alunos da pós-graduação durante a montagem dos experimentos; (F) Torre vertical (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura) com luz no ápice. ....	172
9.3	APÊNDICE C – Caminho percorrido por abelhas <i>A. mellifera</i> africanizada 48 h após a ingestão de alimentos contendo a dose recomendada do Roundup Transorb R® (T5) e do grupo controle (T1), gerado pelo software Bee-move (em fase de registro).....	173

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 ABELHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As abelhas, insetos da ordem Hymenoptera, formam um grupo com mais de 20 mil espécies descritas no mundo (Orr et al., 2020), das quais, aproximadamente, 85% têm hábito solitário (Batra, 1984; Danforth et al., 2019). As espécies sociais constituem colônias com poucos a milhares de indivíduos, enquanto as espécies de abelhas solitárias, as fêmeas fundam e constroem solitariamente seus ninhos, a provisionando-os mais usualmente com pólen e néctar, e abandonando-os antes da emergência de sua prole (Michener, 2007). Assim, nestas abelhas, cada fêmea constrói seu próprio ninho, nidificando em diversos tipos de substratos, diretamente no solo ou em cavidades preexistentes, como em troncos, galhos e ramos de árvores.

Apesar da grande diversidade do grupo, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Apidae, Apinae) é, sem dúvida, uma das espécies mais conhecidas dentre as abelhas. Tal fato, se deve em grande parte, devido à distribuição cosmopolita desta espécie, que por sua vez é decorrente do manejo de suas colônias, pelo próprio homem, há milhares de anos, e hoje sobrevivem em praticamente todos os continentes do planeta (Han et al., 2012; Ruttner et al., 1978). A origem de *A. mellifera* possivelmente ocorreu na África (Michener, 1974), expandindo-se para a Eurásia pelo menos duas vezes, por rota ocidental e oriental, formando populações geograficamente próximas, mas geneticamente distantes (Han et al., 2012; Whitfield et al., 2006). A diversificação geográfica observada para *A. mellifera* está associada a variabilidade genética dentro da espécie, sendo dividida em, pelo menos, 29 subespécies morfofisiologicamente distintas (Parker et al., 2010; Ruttner, 1992).

No Brasil, as primeiras colônias de *A. mellifera* foram introduzidas em 1839, dando início à apicultura no país. Posteriormente, entre os anos de 1845 e 1880, novas subespécies europeias foram trazidas por imigrantes europeus, mas a produtividade de mel era baixa. Buscando potencializar a produtividade, a subespécie africana *A. mellifera scutellata* Lepelletier, 1836 foi introduzida no Brasil em 1956 (Zaluski et al., 2014). Inicialmente o objetivo era cruzar *A. m. scutellata* com as abelhas europeias, dando origem à uma variedade mais bem adaptada às condições tropicais. No entanto, as rainhas de *A. mellifera scutellata* foram acidentalmente liberadas no

ambiente natural, reproduzindo-se e “hibridizando” com subespécies de origem europeia já presentes no país, gerando a variedade africanizada (Pinto et al., 2005; Schneider et al., 2004).

As abelhas africanizadas possuem alguns hábitos que são bem diferentes comparando às subespécies de *A. mellifera* europeias, com destaque para um comportamento mais defensivo e hábito de enxamear com mais frequência (Zaluski et al., 2014). Atualmente, as abelhas africanizadas estão distribuídas por todo território brasileiro, e têm mostrado algumas vantagens, em relação às subespécies europeias puras, como por exemplo, se mostram mais resistentes à doenças, produzem mais mel e própolis, podem suportar condições climáticas mais severas e são polinizadores mais eficientes (Jong, 1996; Zaluski et al., 2014). Além disso, sabe-se que as abelhas africanizadas são mais resistentes ao ácaro *Varroa* sp. (Mesostigmata: Varroidae), devido ao seu hábito de limpeza e a fertilidade reduzida do ácaro nas operárias de abelhas africanizadas, comparando-se com as operárias de abelhas não africanizadas (Calderón et al., 2010).

*Apis mellifera* é uma abelha de comportamento social, que forma colônias populosas, com dezenas de milhares de indivíduos, hábito generalista na exploração de recursos florais, visitando várias espécies de angiospermas para a coleta de alimento, e um sistema de comunicação eficiente no recrutamento de campeiras, que permite a exploração de diferentes fontes de recursos pela colônia como um todo (Michener, 1974). As características citadas tornam essas abelhas excelentes polinizadores, sendo, muitas vezes, capazes de visitar e explorar o dobro de flores quando comparadas a várias outras espécies de abelhas (Hung et al., 2018). Deste modo, *A. mellifera* contribui, usualmente, para o aumento da produtividade de várias culturas agrícolas, como maçã, cereja, tomate, melão, soja, canola e café (Calderone, 2012; Giannini et al., 2015b). Além disso, *A. mellifera* tem sido utilizada como bioindicador para detecção de agrotóxicos nos ecossistemas (Balayiannis e Balayiannis, 2008; Quigley et al., 2019), sendo a espécie mais utilizada para estudos de toxicologia (Battisti et al., 2021; Gill et al., 2017; Ledoux et al., 2020; Siviter et al., 2021).

## 1.2 POLINIZAÇÃO E A IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS

O serviço de polinização é essencial para a manutenção da diversidade das plantas e da composição florística dos diferentes ecossistemas terrestres do mundo (Beringer, 2019). Nas angiospermas, existem vários mecanismos de reprodução nas diferentes espécies, sendo as flores adaptadas a formas diferentes de polinização, podendo ser pela água, pelo vento ou por animais (Culley et al., 2002). A polinização realizada por animais é responsável pela reprodução de, aproximadamente, 90% das angiospermas, o que os tornam essenciais para a produção agrícola e conservação ambiental (Imperatriz-Fonseca et al., 2012).

Dentre as espécies de animais que atuam como polinizadores, as abelhas têm se destacado, sendo responsáveis pela polinização de aproximadamente 90% das culturas agrícolas no mundo (Ollerton et al., 2011; Zattara e Aizen, 2021), o que as tornam vitais para a manutenção da diversidade vegetal em ecossistemas naturais (Klein et al., 2017). Em parte, a dependência das abelhas de recursos alimentares disponibilizados nas flores das angiospermas explica a íntima relação destes insetos com este grupo de plantas. Além disto, tal dependência propiciou a seleção de adaptações morfofisiológicas e comportamentais nas abelhas que aumentam sua eficiência como polinizadores (Imperatriz-Fonseca et al., 2012), surgindo uma co-evolução flor-abelha.

No caso da produção agrícola, a polinização efetuada por animais, com destaque as abelhas, interfere no volume da produção, mas também em aspectos qualitativos de frutos e sementes, fatores que podem contribuir para melhorar a produtividade da cultura (Beringer, 2019; Calderone, 2012). A contribuição econômica pela influência dos polinizadores relacionado a produtividade agrícola mundial, em 2005, girou em torno de US\$ 177,48 bilhões no ano, equivalente a 9,5% da produção (Gallai et al., 2009). No ano de 2015 o valor estimado foi de US\$ 235 bilhões a US\$ 577 bilhões (IPBES, 2016). Nos EUA, o retorno financeiro é de aproximadamente US\$ 25 bilhões por ano, pelo aumento da produtividade, além da produção do mel, com um valor estimado em US\$ 200 milhões (Morais et al., 2012). No Brasil, o valor anual estimado do efeito da polinização animal foi de aproximadamente US\$ 45 bilhões, ressaltando-se que das 141 espécies cultivadas para alimentação humana, em torno de 85 dependem da polinização para aumento da produtividade (Giannini et al.,

2015b). A espécie *A. mellifera* é reconhecidamente o visitante floral mais frequente em lavouras (Garibaldi et al., 2014) e habitats naturais em todo o mundo (Hung et al., 2018).

No Brasil, *A. mellifera* é uma espécie muito importante nos quesitos ecológico e econômico, pois tem hábito generalista, sendo o polinizador mais frequente em vários cultivos agrícolas que são economicamente importantes para o país, nos quais contribui para aumento na produtividade, como a soja (Chiari et al., 2008, 2005) e o café (Peruzzolo et al., 2019). A influência dos polinizadores na manutenção da biodiversidade e produtividade agrícola, deu destaque para os problemas oriundos deste declínio, principalmente das abelhas. Tal fato tem preocupado a comunidade em geral, pois sabe-se que as ações antrópicas têm impactado negativamente as abelhas (Barbosa et al., 2017).

### 1.3 DECLÍNIO POPULACIONAL DAS ABELHAS

Apesar da importância evidente, estudos vêm demonstrando que os polinizadores estão em declínio no mundo, com registros para pelo menos as últimas cinco décadas (Biesmeijer et al., 2006; Goulson et al., 2015; Kluser e Peduzzi, 2007; Zattara e Aizen, 2021). Estima-se que nas próximas décadas aproximadamente 40% das espécies de insetos no mundo serão extintas (Sánchez-Bayo e Wyckhuys, 2019). O desaparecimento dos polinizadores é uma problemática mundial, pois está afetando negativamente os ambientes de forma geral, o que poderá acarretar em uma diminuição da produtividade alimentícia, ao mesmo tempo que a população humana continua aumentando (Dicks et al., 2021; Monquero e Oliveira, 2018).

No caso das abelhas, os primeiros e mais contundentes registros de declínio populacional, parecem coincidir com a redução das colmeias de *A. mellifera* nos EUA, no início do século XXI. Mais precisamente, no final de 2006 apicultores do Estado da Califórnia começaram a relatar a ocorrência de colmeias de *A. mellifera* enfraquecidas, com desaparecimento de grande parte das operárias das colônias, ficando tais colmeias com uma pequena parte das suas operárias, imaturos, a rainha e o alimento estocado nos favos (Dainat et al., 2012; vanEngelsdorp et al., 2009). No mesmo ano, apicultores da costa oeste dos EUA também relataram o mesmo fenômeno. Em consequência deste fato, em 2007, nos EUA, foi realizada uma reunião

com várias instituições, governamentais e não governamentais, para discutir medidas e tentar amenizar tal problema, surgindo então o termo Desordem do Colapso das Colônias (DCC) ou “*Colony Collapse Disorder*” (CCD) (Lima e Rocha, 2012; Pires et al., 2016). Desde então, os EUA realizam levantamentos anuais para verificar a situação das colmeias, com os registros relevando perdas durante todo o ano. Em 2014, por exemplo, registrou-se uma perda de aproximadamente 43% das colônias nos EUA (Lima e Rocha, 2012; Pires et al., 2016).

Na Europa, relatos da diminuição das colônias de *A. mellifera* também datam de cerca de duas décadas. Em 2007, apicultores da Bélgica, França, Holanda, Grécia e Itália relataram perdas de colmeias, porém com sintomas menos intensos daqueles observados nos EUA. Em tal contexto, a preocupação com a redução no número populacional de abelhas melíferas foi ficando cada vez mais frequente (Lima e Rocha, 2012; Pires et al., 2016). Sabe-se que a problemática que envolve o declínio dos polinizadores é relacionada a DCC e a mortalidade, principalmente, das abelhas. A DCC é definida pela diminuição rápida das operárias adultas, no entanto, estas abelhas não são encontradas próximo a colônia (Dainat et al., 2012). No caso da mortalidade, as abelhas adultas mortas são encontradas ao entorno da colônia, e os agrotóxicos estão entre os principais causadores deste problema (Siviter et al., 2021; Sánchez-Bayo et al., 2019). A presença de vários princípios ativos diferentes de agrotóxicos no ambiente tem agravado o problema, pois o efeito tóxico, para as abelhas, é mais danoso, comparando ao efeito isolado de cada composto, pelo sinergismo entre dos compostos, sendo isso o que tem sido testado em laboratório com mais frequência (Siviter et al., 2021).

Uma possível consequência com a perda mundial de polinizadores, dentre estes as abelhas, seria a diminuição da produção agrícola. Neste cenário, pode ocorrer um aumento no desmatamento, na tentativa de aumentar a área de plantio, agravando ainda mais as mudanças climáticas (Aizen et al., 2009), aumentando a perda de polinizadores e causando um ciclo destrutivo. Um estudo realizado nos EUA mostrou evidências da limitação (déficit) de polinizadores em sete culturas produzidas no país, refletindo diretamente numa redução de produtividade para a maioria das culturas estudadas e, como consequência, a queda de rendimentos econômicos (Reilly et al., 2020). No Brasil, a perda de colônias de *A. mellifera*, ou ainda de outras espécies sociais, como no caso das abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) não tem sido registrada de forma tão evidente quanto em outros países. Muito provavelmente, tal

fato está atrelado a uma falta de programas governamentais para registro, organização e levantamentos de apiários e melipnários, ação extremamente necessária na geração de dados confiáveis e oficiais (Pires et al., 2016). De qualquer modo, a presença de patógenos o uso de agrotóxicos tem aumentado a perda de colmeias em território brasileiro (Morais et al., 2012; Pires et al., 2016). O Brasil é um país vulnerável, se for considerado uma redução no número de polinizadores, pois sua economia é fortemente baseada na agricultura e, aproximadamente, 70% da receita gerada pelas principais safras provém de cultivares com algum grau de dependência da polinização (Novais et al., 2016).

Sabe-se que o declínio dos polinizadores não é desencadeado por uma causa isolada, mas sim, a interação de vários fatores (Dicks et al., 2021; Goulson et al., 2015). Entre esses fatores, destacam-se o manejo do solo, fragmentação/destruição dos habitats naturais, a presença de patógenos, fatores que poderiam diminuir a imunidade das abelhas, alterações climáticas, estado nutricional da colônia e o uso abusivo de agrotóxicos na agricultura (Bacaxixi et al., 2011; Dicks et al., 2021; Monquero e Oliveira, 2018; Pires et al., 2016; Raine, 2018). Nos últimos anos o uso exagerado de agrotóxicos, no Brasil e no mundo, associado ao interesse econômico e necessidade de produção de alimentos, como soja, milho e café, tem sido uma das causas que mais têm chamado a atenção de pesquisadores (Battisti et al., 2021; Gill et al., 2018; Motta et al., 2018).

Dentre estas três grandes commodities, o café é de especial interesse por ser uma fonte importante de recursos para as abelhas sociais e solitárias em períodos de floração (Ferrão et al., 2017; Peruzzolo et al., 2019; Willmer e Stone, 1989). No caso do café, a preocupação com o controle de diferentes tipos de pragas tem favorecido o uso de uma gama de agrotóxicos, incluindo diferentes tipos de inseticidas, fungicidas e herbicidas, muitos dos quais têm uso liberado por órgãos governamentais (ADAPAR, 2021; AGROFIT, 2021a). No Estado do Paraná, o segundo maior produtor de grãos do Brasil, e um dos seis principais produtores nacionais de café, também é o segundo maior consumidor de agrotóxicos do país (CONAB, 2020a; Pignati et al., 2017). Assim, principalmente em culturas que são economicamente importantes, como o café, o uso de agrotóxicos tende a ser mais intenso, considerando-se a importância econômica mundial e nacional desta cultura (Brovini et al., 2021; CONAB, 2020, 2017).

Enfatizou-se o café neste trabalho, pois a demanda para o desenvolvimento da

pesquisa surgiu de um projeto aprovado na chamada CNPq/MCTIC/IBAMA/Associação ABELHA Nº 32/2017, cujo título é “Serviço de polinização nas principais regiões produtoras de café no Brasil: biodiversidade, avaliação bioeconômica e intensificação ecológica”. A organizadora é a Profa. Dra. Maria Cristina Gaglianone da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O objetivo geral do projeto foi obter um diagnóstico dos serviços de polinização para duas espécies de cafeeiro em plantios nas regiões sudeste e sul do Brasil, utilizando uma abordagem baseada no conceito de intensificação ecológica, e envolvendo a comunidade como elemento chave na obtenção das informações e na troca de experiências. Nessa perspectiva, surgiu a necessidade de avaliar a toxicidade do GLY para as abelhas, pois é o agrotóxico mais utilizado nos cultivos de café. Destacou-se também a espécie *A. mellifera*, que representa o visitante floral mais frequente no café no estado do Paraná e o produto formulado Roundup Transorb R, o qual é registrado e utilizado no cultivo do café (AGROFIT, 2021).

#### 1.4 CULTURA DO CAFÉ E ABELHAS

O café (*Coffea* spp.) foi inicialmente classificado como uma planta com características medicinais, mas entrou definitivamente nos compêndios botânicos por intermédio do naturalista Lineu, no livro *Systema Naturae*, publicado em 1735. Seus primeiros registros históricos foram no lêmén, antes do século XV, chegando a Europa em 1615 e na América do Norte em 1668. Os holandeses introduziram a cultura do café na América em 1718, os quais levaram para a Índia (atualmente Indonésia) em 1899. No Brasil, foi introduzido no Pará pela Guiana Francesa em 1727, espalhando-se por vários estados do país (Ferrão et al., 2017).

Existem em torno de 124 espécies do gênero *Coffea* catalogadas, porém, as espécies *Coffea arabica* Linnaeus (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café conilon ou robusta) são as mais importantes economicamente, sendo responsáveis por quase todo o café consumido no mundo (Farah e Santos, 2015). A flor da espécie *C. arabica* é monoica, isto é, apresenta aparelho reprodutivo masculino e feminino, e, teoricamente, não precisariam dos agentes de polinização por realizarem autofecundação, enquanto *C. canephora*, que também possuem flores monoicas, mas

são autoincomatível, sendo dependente da fecundação cruzada (Conagin e Mendes, 1961). No caso de *C. arabica*, contudo, sabe-se que a presença de polinizadores influencia positivamente a produtividade do café, além de favorecer o aumento da variabilidade genética (Ferrão et al., 2017).

A presença dos polinizadores na produção do café pode influenciar no aumentando da produtividade, proporcionando a formação de um número maior de frutos por planta, além da quantidade e qualidade dos grãos de café (Classen et al., 2014; Latini et al., 2020; Saturni et al., 2016). Entre os principais agentes de polinização que visitam as flores do café, destaca-se a abelha *A. mellifera*, espécie que pode influenciar positivamente a produção desta cultura, variando entre 28% e 168,4% na produtividade (D'Avila e Marchini, 2005; Latini et al., 2020; Saturni et al., 2016). No entanto, espécies de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) também são importantes polinizadores do café, por exemplo, *Trigona spinipes* Fabricius, 1793, *Trigona hyalinata* Lepeletier, 1836, *Partrigona subnuda* Moure, 1947 e *Tetratrigona angustula* Illiger, 1806 (Saturni et al., 2016).

Na contemporaneidade, o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, sendo essa cultura muito importante para a economia do país. Entre os anos de 2008 a 2017, o Brasil foi responsável por 32,38% da produção e 30,45% da exportação mundial de café (CONAB, 2017). Em 2018, a área total de produção foi de 2.158.516,9 ha e a produtividade de, aproximadamente, 61 milhões de sacas, já em 2019 a área de produção foi de 2.131.826 ha e a produção foi de 49 milhões de sacas (CONAB, 2019). Já em 2020 houve um incremento de 29% na produtividade e 1,4% na área de produção comparando-se ao ano anterior, com área de produção de 2.161.942 ha e produção de 63,08 milhões de sacas (CONAB, 2020a).

O Paraná, além de ser o segundo maior produtor de grãos do Brasil (Pignati et al., 2017), é o estado brasileiro com a sexta colocação em termos de produtividade de café, sendo a espécie *C. arabica* a cultura predominante (CONAB, 2020, 2017). A produção de café no Paraná, entre 2008 a 2017, representou em média 4,4% da produção nacional (café arábica), gerando em média de 24 scs/ha (CONAB, 2017). Já em 2019 a produção de café no estado do Paraná foi de 1,93% e 2020 foi de aproximadamente 1% (CONAB 2020). Além disso, a área total de produção de café no estado foi de 39.200 ha (2019) e 37.536 ha (2020), sendo responsável por produzir 953 mil sacas e 941,9 mil sacas, respectivamente (CONAB, 2020).

Em tal contexto, apesar da alta produtividade e de tecnologias desenvolvidas

para tal, existem vários desafios na produção do café. A presença de insetos que podem danificar a planta, ou de vegetais que competem por recursos naturais, são fatores que podem diminuir o rendimento do cafeeiro (Alves e Cunha, 2014). Para mitigar o problema, e manter a alta produtividade, há décadas vem se utilizando agrotóxicos de forma intensiva, muitas vezes sem uma análise ou acompanhamento da lavoura, o que tem acarretado diversos em diversos problemas ambientais, por exemplo, em organismos não-alvo como as abelhas.

## 1.5 AGROTÓXICOS E ABELHAS

Os agrotóxicos são produtos formulados a base de agentes físicos, químicos e biológicos, agindo como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento, podendo ser utilizados em cultivos agrícolas, pastagens, florestas e ambientes urbanos, como descrito no Art. 2 da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989). Os agrotóxicos são sintetizados para agir em um grupo de “organismos-alvo”, inibindo ou estimulando vias metabólicas específicas, entretanto, sua toxicidade não é exclusiva a este grupo, podendo afetar organismos não-alvo que apresentem metabolismo semelhante (Chmiel et al., 2020; Sanchez-Bayo e Goka, 2016). Sendo assim, muitos agrotóxicos podem causar efeitos letais e subletais em abelhas (Gonalons e Farina, 2018; Sanchez-Bayo e Goka, 2016; Siviter et al., 2018; Zhu et al., 2017a; Zhu et al., 2017b). As vias de contaminação das abelhas aos diferentes tipos de agrotóxicos ocorrem por via oral (néctar, pólen e água), contato com gotículas dos produtos, podendo transportar até os ninhos ou colônias, fornecendo-os as larvas (Raine e Gill et al., 2015; Sanchez-Bayo e Goka, 2016).

A toxicidade de um agrotóxico é definida pela dose que é letal para 50% dos indivíduos de uma espécie ( $DL_{50}$ ), variando de espécie para espécie. Doses inferiores a  $DL_{50}$  são consideradas como doses subletais (Sanchez-Bayo e Goka, 2016). O contato das abelhas com os agrotóxicos pode causar mortalidade, principalmente se ponderarmos o sinergismo entre os diferentes princípios ativos encontrados nos agroecossistemas (Siviter et al., 2021), além da interação dos agrotóxicos com o ácaro *Varroa* e patógenos virais (Sánchez-Bayo et al., 2016). Tais fatores podem potencializar o efeito tóxico dos princípios ativos para as abelhas.

Se o agrotóxico não matar a abelha, ele pode causar efeitos subletais, afetando negativamente marcadores bioquímicos, o crescimento/desenvolvimento corporal, a imunidade, a fecundidade, a função motora, o comportamento e a cognição (Chmiel et al., 2020; Desneux et al., 2007). A espécie de abelha mais utilizada como modelo para estudos de toxicologia, sem dúvida é *A. mellifera* (Siviter et al., 2021). Por isso, no decorrer da tese, a maioria dos exemplos usados foram com tal espécie. No entanto, sabe-se que o efeito tóxico de um princípio ativo muda entre as diferentes espécies.

De acordo com a natureza do organismo-alvo combatido, os agrotóxicos podem ser classificados em inseticidas, fungicidas, desfoliantes, fumigantes, acaricidas, raticidas, moluscidas, nematocidas, acaricidas e herbicidas (Peres et al., 2003). Os herbicidas são amplamente utilizados na agricultura, mas apesar de não terem ação direta sobre as abelhas, podem impactá-las negativamente, reduzindo os locais de abrigo e o número de flores silvestres, como nas estações de refúgio, além de poder causar efeitos letais e subletais (Abraham et al., 2018; Gregorc e Ellis, 2011; Monquero e Oliveira, 2018; Pinheiro e Freitas, 2010).

O agrotóxico mais vendido no mundo é o glifosato (GLY do inglês *glyphosate*), um herbicida [N- (fosfonometil) glicina], cuja fórmula molecular é  $C_3H_8NO_5P$  (m.m. = 169,1 g/mol) (AGROFIT, 2020). O GLY foi desenvolvido nos anos 1950 pela indústria farmacêutica, e ficou “famoso” a partir dos anos 1970 quando passou a ser utilizado como dessecante de plantas (Benbrook, 2016). O Brasil, é um país com clima favorável à agricultura e está entre os países que mais consomem agrotóxicos no mundo (IBAMA, 2020). Na contemporaneidade, existem vários produtos formulados a base de GLY no Brasil, os quais representaram 38,61% dos agrotóxicos comercializados em 2019 (IBAMA, 2020), sendo utilizados em vários cultivos agrícolas, como o café (AGROFIT, 2021).

Os capítulos 1 e 2 desta tese são revisões de literatura, cujo objetivo foi descrever com mais detalhes os efeitos tóxicos (letais e subletais) do GLY, puro ou formulado, para as diversas espécies de abelhas pela exposição crônica ou aguda. No capítulo 1 desenvolveu-se uma revisão sistemática (breve revisão) sobre os efeitos subletais do GLY e seus formulados em abelhas. Já no capítulo 2, desenvolveu-se uma meta-análise, com intuito de avaliar o efeito letal do GLY e seus formulados em abelhas.

## 1.6 REVISÕES SISTEMÁTICAS E META-ANÁLISE

As revisões bibliográficas, ou de literatura, têm sido utilizadas com frequência em artigos científicos, dando sustentação teórica para uma teoria ou conceito técnico (Okoli et al., 2019; PRISMA, 2015). O acúmulo de evidências na literatura científica torna as revisões excelentes ferramentas para compilar resultados de vários artigos, facilitando o acesso, proporcionando uma visão geral sobre o tema abordado (Sampaio e Mancini, 2007). Entre os vários modelos de revisões, a revisão sistemática (RS) é uma forma de revisão planejada, que utiliza métodos sistemáticos para avaliar, criteriosamente, estudos primários, relacionados a um determinado assunto (Fontes-Pereira, 2017/; Okoli et al., 2019; Sampaio e Mancini, 2007).

A meta-análise é uma modalidade de revisão sistemática que tem como objetivo extrair informações adicionais de dados preexistentes, unindo resultados de diversos trabalhos, aplicando-se uma ou mais técnicas estatísticas (Luiz, 2002). Uma análise primária dos dados é aquela realizada originalmente no estudo, sendo que, a análise secundária é a “reanálise” dos dados, com o objetivo de responder a uma pergunta original da pesquisa com melhores técnicas estatísticas, ou responder a novas perguntas com dados antigos. A meta-análise é uma forma secundária, referindo-se a “análise das análises”, avaliando os dados de vários estudos individuais com o objetivo de integrar os resultados (Glass, 1976).

Ao desenvolver uma meta-análise tem-se a obtenção de uma resposta única para vários trabalhos distintos, isto é, permite combinar resultados em um único sumário estatístico (Lefebvre et al., 2008). O interesse em uma medida resumida dos fatos, está relacionada a quantidade de artigos publicados em cada área de conhecimento, que apesar de abordarem o mesmo assunto, muitas vezes possuem conclusões conflitantes (Okin, 1995, 1992).

Em determinadas áreas de conhecimento, os dados publicados podem apresentar resultados conclusivos ou não, o que pode ser explicado por um tamanho insuficiente da amostra ou  $n$ . Com a meta-análise, pode-se sintetizar dados que são contraditórios, por menor que seja sua potência analítica, pois o reagrupamento de vários experimentos, aumenta a precisão do efeito analisado no tratamento (Lovatto et al., 2007). Em tal contexto, os resultados obtidos a partir de uma meta-análise asseguram uma resposta estatisticamente confiável, podendo evidenciar o efeito de um tratamento com baixo número amostral, evidenciando as diferenças entre

tratamentos, caso existam. Entretanto, não é garantido que a meta-análise gere resultados conclusivos (Fagard et al., 1996), contudo, podem apresentar melhor representatividade dos dados.

Quando se desenvolve uma meta-análise, o resultado final se aproxima mais ao efeito da aplicação prática do tratamento. Cada tratamento, quando considerado individualmente, foi realizado com cuidados específicos, muitas vezes distantes do conjunto populacional. Ao reagrupar esses tratamentos, com características diferentes, aplicando-se a meta-análise, ocorre um ajustamento da média geral dos estudos aos fatores de variação. Assim, o efeito é avaliado levando em consideração diferentes condições, o que aumenta a aplicabilidade (Lovatto et al., 2007).

Para realizar uma meta-análise, precisa-se seguir sete etapas importantes, sendo elas adaptadas ao objetivo do estudo. Tais etapas são: (1) Identificação/formulação do problema de pesquisa; (2) Coleta da literatura (livros, artigos, teses, documentos, artigos não publicados, etc.); (3) Coleta das informações de cada estudo; (4) Avaliação da qualidade dos estudos; (5) Análise e síntese dos resultados dos estudos; (6) Interpretação dos dados coletados; (7) Apresentação dos resultados de pesquisa (Filho et al., 2014).

Apesar do enorme interesse sobre os efeitos tóxicos de produtos à base de GLY sobre as abelhas e do desenvolvimento de muitas pesquisas na área, o número de publicações sobre tal assunto ainda é reduzido, comparado aos estudos com inseticidas, em muitas vezes apresentam resultados/conclusões conflitantes. Nesse sentido, a realização de uma meta-análise torna-se uma ferramenta interessante para compilar os resultados e gerar uma conclusão confiável sobre o assunto.

Revisões sistemáticas de literatura são indispensáveis para a Ciência. Temas controversos e com alto impacto na sociedade geralmente despertam o interesse de um número maior de pesquisadores, sendo assim, são estudados com mais frequência, gerando um acúmulo de publicações científicas. Revisões de literatura são indispensáveis para definição do problema, além de proporcionar uma noção precisa sobre o estado atual do conhecimento sobre o assunto, contribuindo para futuras pesquisas.

## 1.7 REFERÊNCIAS

Abraham, J., Benhotons, G.S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., Abraham, J.D.,

2018. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 166, 695–702. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- ADAPAR - Agência de defesa agropecuária do Paraná, 2021. Agrotóxicos no Paraná. Agrotóxicos liberados para uso no estado. [WWW Document]. URL <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/listar.asp?Cod=1639&descIngrediente=&CodIngredienteAtivo=null&CodFormulacao=null&IdRegistrante=null&CodFormaAcao=null&CodAlvo=null&CodGrupoQuimico=null&CodClassToxicologica=null&CodSituacao=null&CodClassificacao=n>
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021. Relatórios de Produtos Formulados [WWW Document]. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M., 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.* 103, 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Alves, G.S., Cunha, J.P.A.R. da, 2014. Field data and prediction models of pesticide spray drift on coffee crop. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 49, 622–629. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800006>
- Amarante Junior, O.P., Dos Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova* 25, 589–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400014>
- Bacaxixi, P., Bueno, C.E.M.S., Ricardo, H.A., Epiphanyo, P.D., Silva, D.P., Barros, B.M.C., Silva, T.F., Bosquê, G.G., Lima, F.C.C., 2011. a Importância Da Apicultura No Brasil. *Rev. Científica Eletrônica Agron.* 5.
- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 462–470. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>
- Barbosa, D.B., Crupinski, E.F., Silveira, R.N., Limberger, D.C.H., 2017. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 3, 694–703. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>
- Batra, S.W.T., 1984. Solitary bees. *Sci. Am.* 250, 120–127.

- Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A.R., de Castilhos Ghisi, N., Costa-Maia, F.M., Abati, R., dos Reis Martinez, C.B., Sofia, S.H., 2021. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Sci. Total Environ.* 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Beringer, J., 2019. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 5, 18–27. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (80-. ). 313, 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.
- Brasil. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)> Acesso em: 30 nov. 2021
- Brovini, E.M., de Deus, B.C.T., Vilas-Boas, J.A., Quadra, G.R., Carvalho, L., Mendonça, R.F., Pereira, R. de O., Cardoso, S.J., 2021. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Sci. Total Environ.* 771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>
- Calderón, R.A., van Veen, J.W., Sommeijer, M.J., Sanchez, L.A., 2010. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 50, 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9325-4>

- Calderone, N.W., 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS One* 7, 24–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>
- Carraschi, S.P., Cubo, P., Schiavetti, B.L., Shiogiri, N.S., da Cruz, C., Pitelli, R.A., 2011. Toxic effects of phytosanitary surfactants for jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Sci. - Biol. Sci.* 33, 191–196. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v33i2.6252>
- Chiari, W.C., de Toledo, V. de A.A., Hoffmann-Campo, C.B., Rúvolo-Takasusuki, M.C.C., de Toledo, T.C.S. de O.A., Lopes, T. da S., 2008. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. *Acta Sci. - Agron.* 30, 267–271.
- Chiari, W.C., De Toledo, V.D.A.A., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Braz De Oliveira, A.J., Sakaguti, E.S., Attencia, V.M., Costa, F.M., Mitsui, M.H., 2005. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 31–36. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000100005>
- Classen, A., Peters, M.K., Ferger, S.W., Helbig-Bonitz, M., Schmack, J.M., Maassen, G., Schleuning, M., Kalko, E.K.V., Böhning-Gaese, K., Steffan-Dewenter, I., 2014. Complementary ecosystem services provided by pest predators and pollinators increase quantity and quality of coffee yields. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3148>
- Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB), 2020. Acompanhamento da Safra Brasileira - CAFÉ. *Obs. Agrícola* 6, 1–60.
- CONAB, 2019. Acompanhamento da safra brasileira de café. *Quarto Levant.* 5, 1–44.
- CONAB, 2017. A Cultura do Café: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2008 a 2017. *Camp. Nac. Abast.* 12, 54.
- Conagin, C.H.T.M., Mendes, A.J.T., 1961. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. *Pesqui. Citológicas e Genéticas* 20, 18.
- Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* 17, 491.

[https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(02\)02600-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(02)02600-9)

- D'Avila, M., Marchini, L.C., 2005. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. *B. Industr.anim.* 62, 79–90.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., Neumann, P., 2012. Colony collapse disorder in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
- Danforth, B.N., Minckley, R.L., Neff, J.L., 2019. *The Biology of Solitary Bees: Biology, Evolution, Conservation*. Princeton University Press, Princeton.
- Dicks, L. V., Breeze, T. D., Ngo, H. T., Senapathi, D., An, J., Aizen, M. A., Basu, P., Buchori, D., Galetto, L., Garibaldi, L. A., Gemmill-Herren, B., Howlett, B. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Johnson, S. D., Kovács-Hostyánszki, A., Kwon, Y. J., Lattorff, H. M. G., Lungharwo, T., Seymour, C. L., ... Potts, S. G. (2021). A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Nature Ecology and Evolution*, 5(10), 1453–1461. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01534-9>
- Fagard, R.H., Staessen, J.A., LutgardeThijs, 1996. Advantages and disadvantages of the meta-analysis approach. *J. Hypertens.* 14, 9–13. <https://doi.org/10.1097/00004872-199609002-00004>
- Farah, A., Santos, T.F. dos, 2015. The Coffee Plant and Beans: An Introduction, in: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., p. 5–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>
- Ferrão, R., Fonseca, A.F., Ferrão, M.A.G., Muner, L., 2017. *Café Conilon*, Incaper, Vitória, ES. 2nd ed., 786p
- Filho, D.B.S., Paranhos, R., Júnior, J.A.S., Rocha, E.C., Alves, D.F., 2014. O que é, para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teor. e Pesqui.* 23, 205–228. <https://doi.org/10.4322/tp.2014.018>
- Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A.D.M.P., Galetto, L., Nates-Parra, G., Javier, J., 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie* 40, 332–346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>

- Fontes-pereira, A., 2017. Revisão sistemática da literatura: como escrever um artigo científico em 72 horas, Smirna Cav. ed. Rio de Janeiro, RJ.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Galli, A.J.B., Montezuma, M.C., 2005. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. *Monsanto* 66. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>
- Garibaldi, L.A., Steffan-dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., 2014. Honey Bee Abundance. *Science* (80-. ). 339, 1608–1611.
- Ghisi, N. de C., Oliveira, E.C. de, Prioli, A.J., 2016. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* 145, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>
- Giannini, T.C., Cordeiro, G.D., Freitas, B.M., Saraiva, A.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2015. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108, 849–857. <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Glass, G. V, 1976. Primary , Secondary , 5, 3–8.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-. ). 347. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Gonalons, C.M., Farina, W.M., 2018. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.176644>
- Gregorc, A., Ellis, J., 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol* 99,

200–207.

- Han, F., Wallberg, A., Webster, M.T., 2012. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2, 1949–1957. <https://doi.org/10.1002/ece3.312>
- Hung, K.L.J., Kingston, J.M., Albrecht, M., Holway, D.A., Kohn, J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- IBAMA - Ministério do meio ambiente, 2020. Relatórios de comercialização de agrotóxicos [WWW Document]. URL <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>
- Imperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D. de A., Saraiva, A.M., 2012. Polinizadores e Polinização – um Tema Global, in: *Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo, p. 489.
- IPBES, 2016. *Pollination and, Science*.
- Johnson, R.M., 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A.B., Lihoreau, M., 2017. Why bees are so vulnerable to environmental stressors 32, 268–278.
- Kluser, S., Peduzzi, P., 2007. Global pollinator decline : A literature review. *Conserv. Ecol.* 1–10.
- Latini, A.O., Silva, D.P., Souza, F.M.L., Ferreira, M.C., Moura, M.S. de, Suarez, N.F., 2020. Reconciling coffee productivity and natural vegetation conservation in an agroecosystem landscape in Brazil. *J. Nat. Conserv.* 57. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125902>
- Ledoux, M.L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L., Lee, S.O., 2020. Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control* 109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106859>

- Lefebvre, C., Manheimer, E., Glanville, J., 2008. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. <https://doi.org/10.1002/9781119536604>
- Lima, M.C. de, Rocha, S. de A., 2012. Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil, IBAMA (Ins. ed. Brasília - DF).
- Lovatto, P.A., Lehnen, C.R., Andretta, I., Carvalho, A.D., Hauschild, L., 2007. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 285–294. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007001000026>
- Luiz, A.J., 2002. Meta-Análise: Definição, Aplicações E Sinergia Com Dados Espaciais. *Cad. Ciência Tecnol.* 19, 407–428.
- Lunardi, J.S., 2018. Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de *Apis mellifera* L. Diss. apresentada ao Inst. Biociências da Univ. Estadual Paul. 4–72.
- Michener, C., 2007. *The Bees of the World*. Baltimore, The John Hopkins University Press, 2nd ed., 953p
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees: A comparative study*, Harvard, 404p
- Monquero, P.A., Oliveira, A.S., 2018. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas? *Rev. Bras. Herbic.* 1, 95. <https://doi.org/10.7824/rbh.v1i1.533>
- MONSANTO, 2021. Sobre Produtos Roundup® [WWW Document]. URL <http://www.roundup.com.br/produtos-da-familia-roundup>
- Morais, M.M., Jong, D. De, Message, D., Gonçalves, L.S., 2012. Perspectivas e Desafios para o Uso das Abelhas *Apis mellifera* como Polinizadores no Brasil, in: *Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo, p. 489.
- Motta, E.V.S., Mak, M., De Jong, T.K., Powell, J.E., O'Donnell, A., Suhr, K.J., Riddington, I.M., Moran, N.A., 2020. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E.V.S., Raymann, K., Moran, N.A., 2018. Glyphosate perturbs the gut

- microbiota of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Nagy, K., Duca, R.C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P.T.J., Godderis, L., Ádám, B., 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations, *Environmental Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
- Novais, S.M.A., Nunes, C.A., Santos, N.B., D'Amico, A.R., Fernandes, G.W., Quesada, M., Braga, R.F., Neves, A.C.O., 2016. Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *PLoS One* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167292>
- Odemer, R., Alkassab, A.T., Bischoff, G., Frommberger, M., Wernecke, A., Wirtz, I.P., Pistorius, J., Odemer, F., 2020. Chronic high glyphosate exposure delays individual worker bee (*Apis mellifera* L.) development under field conditions. *Insects* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects11100664>
- Oliveira, P.E., Maruyama, P.K., 2014. Sistemas reprodutivos, in: *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro, p. 532.
- Olkin, I., 1995. Statistical and theoretical considerations in meta-analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 48, 133–146. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)00136-E](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)00136-E)
- Olkin, L., 1992. Meta-analysis: methods for combining independent studies. *Stat. Sci.* 7.
- Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.-D., Ascher, J.S., 2020. Global patterns and drivers of bee distribution. *Curr. Biol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>
- Okoli, C., Duarte, T. por:David W.A., Mattar, R. técnica e introdução:João, 2019. Guia Para Realizar uma Revisão Sistemática de Literatura. *EaD em Foco* 9, 1–40. <https://doi.org/10.18264/eadf.v9i1.748>
- Parker, R., Melathopoulos, A.P., White, R., Pernal, S.F., Guarna, M.M., Foster, L.J., 2010. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011096>
- Pereira, A., 2010. Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de

abelhas. Aleph.

- Peres, F., Moreira, J. C., Dubois, G. S. (2003). Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Frederico Peres; Josino Costa Moreira. (Org.). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. 1ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003, v. 1, p. 21-41.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>
- Peruzzolo, M.C., Cruz, B.C.F. da, Ronqui, L., 2019. Polinização e produtividade do café no Brasil. *Pubvet* 14, 1–6. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a317.1-6>
- Pignati, W.A., e Lima, F.A.N. de S., de Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.D.C., Pignatti, M.G., 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. *Cienc. e Saude Coletiva* 22, 3281–3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>
- Pinheiro, J.N., Freitas, B.M., 2010. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Aust.* 14, 266–281. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.16>
- Pinto, M.A., Rubink, W.L., Patton, J.C., Coulson, R.N., Johnston, J.S., 2005. Africanization in the United States: Replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. *Genetics* 170, 1653–1665. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035030>
- Pires, C.S.S., de Mello Pereira, F., do Rêgo Lopes, M.T., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, É.W., 2016. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 422–442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- PRISMA - Transparent reporting of systematic reviews and meta-analyses, 2015.

Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 24, 335–342.

Quigley, T.P., Amdam, G. V., Harwood, G.H., 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 35, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.08.012>

Raine, B.N.E., 2018. of Bumblebees Inside the Nest. *Science* (80-. ). 362, 643–645.

Raine, N.E., Gill, R.J., 2015. Ecology: Tasteless pesticides affect bees in the field. *Nature* 521, 38–40. <https://doi.org/10.1038/nature14391>

Reilly, J.R., Artz, D.R., Biddinger, D., Bobiwash, K., Boyle, N.K., Brittain, C., Brokaw, J., Campbell, J.W., Daniels, J., Elle, E., Ellis, J.D., Fleischer, S.J., Gibbs, J., Gillespie, R.L., Gundersen, K.B., Gut, L., Hoffman, G., Joshi, N., Lundin, O., Mason, K., McGrady, C.M., Peterson, S.S., Pitts-Singer, T.L., Rao, S., Rothwell, N., Rowe, L., Ward, K.L., Williams, N.M., Wilson, J.K., Isaacs, R., Winfree, R., 2020. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators: Pollination limitation in US crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 2–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>

Ruttner, F., 1992. *Naturgeschichte der Honigbienen*, Ehrenwirth. ed. München.

Sampaio, R., Mancini, M., 2007. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. *Rev. Bras. Fisioter.* 11, 83–89. <https://doi.org/10.1057/9781137328533>

Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>

Saturni, F.T., Jaffé, R., Metzger, J.P., 2016. Landscape structure influences bee community and coffee pollination at different spatial scales. *Agric. Ecosyst. Environ.* 235, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.008>

Schneider, S.S., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, D.R., 2004. The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 351–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123359>

Siviter, H., Bailes, E.J., Martin, C.D., Oliver, T.R., Koricheva, J., Leadbeater, E., Brown,

- M.J.F., 2021. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature* 596, 389–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03787-7>
- Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M.J.F., Leadbeater, E., 2018. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *J. Appl. Ecol.* 55, 2812–2821. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13193>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vázquez, D.E., Balbuena, M.S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., Farina, W.M., 2020. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A. V., Weaver, D., Tsutsui, W.D., 2006. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* (80-. ). 314, 642–645. <https://doi.org/10.1126/science.1132772>
- Willmer, P.G., Stone, G.N., 1989. Incidence of entomophilous pollination of lowland coffee (*Coffea canephora*); the role of leaf cutter bees in Papua New Guinea. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 113–124. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb02380.x>
- WorldAtlas, 2021. Top Pesticide Using Countries [WWW Document]. URL <https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>
- Zaluski, R., Kadri, S.M., de Souza, E.A., da Silva, V.M.C., da Silva, J.R.C., Rodrigues-Orsi, P., Orsi, R. de O., 2014. Africanized honeybees in urban areas: A public health concern. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 659–662. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0254-2013>
- Zattara, E.E., Aizen, M.A., 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>

- Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus 1, 125–144.
- Zhu, Y.C., Adamczyk, J., Rinderer, T., Yao, J., Danka, R., Luttrell, R., Gore, J., 2015. Spray Toxicity and Risk Potential of 42 Commonly Used Formulations of Row Crop Pesticides to Adult Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 108, 2640–2647. <https://doi.org/10.1093/jee/tov269>
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017a). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421>
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017b). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176837>

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a toxicidade do herbicida glifosato e suas diferentes formulações, com ênfase para o Roundup Transorb R<sup>®</sup>, para as abelhas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre os efeitos subletais provocados pelo GLY e suas formulações para as abelhas.
- Avaliar se a exposição (crônica ou aguda) do GLY puro ou formulado por via oral, contato, pulverização e tópica pode causar a morte (efeito letal) em diversas espécies de abelhas por meio de uma meta-análise.
- Avaliar a toxicidade, por via oral e tópica, da exposição crônica e aguda do herbicida glifosato (Roundup Transorb R<sup>®</sup>) na mortalidade, caminhada, deslocamento vertical, queda e danos no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* africanizada, em condições de laboratório.

### **3 CAPÍTULO 1: EFEITOS SUBLETAIS DO GLIFOSATO PURO OU FORMULADO EM ABELHAS: UMA BREVE REVISÃO**

#### **RESUMO**

A diversidade de abelhas e outros polinizadores têm diminuído drasticamente nos últimos anos e o uso de agrotóxicos tem sido relacionado com tal problema. Estudos mostram que mesmo herbicidas podem impactar negativamente populações de abelhas, podendo causar a morte ou comprometer a saúde destes insetos. Com isso, a preocupação acerca do uso do glifosato (GLY) na agricultura aumentou nas últimas décadas, visto que é o agrotóxico mais vendido no mundo. As abelhas podem se contaminar com GLY dentro ou fora dos ninhos, por meio da água ou alimentos contaminados levados para estes locais, no momento da pulverização ou em contato com uma planta recém pulverizada. Estudos têm mostrado que a exposição das abelhas ao GLY pode desencadear efeitos subletais que alteram aspectos fisiológicos. Nessa perspectiva, considerando a velocidade com que as informações científicas são publicadas, revisões tornam-se extremamente importantes para integração do conhecimento, auxiliando na melhor compreensão sobre o tema. Diante disso, o presente estudo visou realizar uma revisão na literatura sobre os efeitos subletais do GLY e as diferentes formulações comerciais deste herbicida em abelhas. Os dados aqui analisados demonstram claramente que exposições, aguda e crônica, de larvas e adultos de abelhas, sociais e solitárias, ao GLY e seus formulados podem desencadear alterações na expressão gênica, funcionamento enzimático, metabolismo oxidativo, estrutura de células/tecidos, diversidade da microbiota intestinal, aprendizagem, consumo de alimentos, capacidade de voo e no deslocamento vertical, ciclo circadiano e desenvolvimento corporal destes insetos. Ao se considerar as espécies sociais, todos estes fatores podem acabar refletindo negativamente na homeostase da colônia. Neste contexto, mais estudos que permitam compreender os efeitos subletais do GLY e seus formulados em abelhas, especialmente em médio e longo prazos sobre a homeostase das colônias são ainda necessários, sobretudo se consideramos a falta de informações sobre a toxicidade de alguns surfactantes presentes nas diferentes formulações comerciais do GLY, hoje disponíveis e utilizadas na agricultura mundial.

**Palavras-Chave:** Abelhas solitárias, agrotóxicos, toxicidade, herbicida

### 3.1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas (Brovini et al., 2021; Zhang et al., 2011), principalmente pelo uso de cultivos transgênicos e o aumento de pragas agrícolas nas lavouras (Bombardi, 2017; Pignati et al., 2017; Zhang et al., 2011). Entre os países com maior consumo anual de agrotóxicos estão a China, EUA, Argentina, Tailândia e Brasil (Sharma et al., 2019; WorldAtlas, 2021). Os agrotóxicos mais vendidos no mundo são os herbicidas à base de glifosato (GLY), representando, aproximadamente, 71,6% dos ingredientes ativos comercializados (Benbrook, 2016), destacando-se também no Brasil, o qual representa 31,45% (IBAMA, 2020).

O GLY é um herbicida do grupo químico [N- (fosfometil) glicina], e sua fórmula molecular é  $C_3H_8NO_5P$  (Peso molecular =  $169,1 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (Dill et al., 2010; Richmond, 2018). Geralmente, é formulado em sua forma de sal de isopropilamina (sal IPA), porém, várias outras formas químicas relacionadas também são comercializadas. O GLY atua inibindo a biossíntese de aminoácidos em plantas e em alguns microrganismos. Este princípio ativo bloqueia o funcionamento da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que atua na via metabólica do “ácido shiquímico”, importante na formação dos aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, utilizados para a síntese de proteínas (Amarante Junior et al., 2002; Ledoux et al., 2020).

Desenvolvido nos anos de 1950 pela indústria farmacêutica, o GLY foi introduzido no mercado como Roundup™ e utilizado como herbicida na década de 1970, incluindo também o surfactante polioxietilenamina (POEA) na formulação do produto comercial (Benbrook, 2016; Pérez et al., 2011). Atualmente, existem várias formulações à base de GLY, as quais contêm misturas com os ingredientes inertes (adjuvantes / surfactantes), que potencializam a penetração no vegetal. No entanto, a composição destes ingredientes inertes, em algumas situações, ainda é desconhecida, o que dificulta estudos de toxicologia, visto que os surfactantes também podem ser tóxicos para os animais (Carraschi et al., 2011; Nagy et al., 2020).

A utilização do GLY para o controle de plantas invasoras é ampla, sendo

aplicado em culturas como a cana-de-açúcar, arroz, citros, maçã, milho, soja, uva, fumo, banana, ameixa, cacau, pera, nectarina, pêsego, seringueira, algodão, pastagens, café, entre outras (AGROFIT, 2021). Comparando-se com outros agrotóxicos, os produtos à base GLY movimentam, aproximadamente, U\$ 1,2 bilhão por ano no mundo (Benbrook, 2016). No Brasil, entre os pesticidas, o GLY foi princípio ativo mais vendido nos últimos anos, sendo o consumo em 2019 foi de aproximadamente 217.592,24 toneladas de ingrediente ativo (IBAMA, 2020).

As atividades agrícolas tornaram-se dependentes do uso dos herbicidas à base de GLY, principalmente, após o surgimento de plantas geneticamente modificadas, gerando um aumento exponencial no consumo mundial (Richmond, 2018). O uso excessivo destes produtos tem impactado negativamente os ecossistemas, ocasionando a contaminação do solo e da água, além de causar efeitos letais e subletais nos seres vivos, inclusive nas abelhas (Battisti et al., 2021; Giesy et al., 2000; Gill et al., 2018; IARC, 2017).

As abelhas são os principais agentes polinizadores animais de ecossistemas naturais e agrícolas (Klein et al., 2017; Michener, 2007; Ollerton et al., 2011; Zattara e Aizen, 2021). O serviço de polinização realizado por abelhas é responsável pela fecundação cruzada de uma grande parte das angiospermas, que têm uma íntima história evolutiva com estes visitantes florais, ao longo de muitos milhões de anos (Michener, 2007). Dentre os benefícios resultantes do papel desempenhado por abelhas, e outros polinizadores, estão o aumento da variabilidade genética das plantas favorecidas e da produtividade agrícola (Allen-wardell et al., 1998; Stein et al., 2017). Estima-se que entre 70-90% das culturas agrícolas sejam visitadas por abelhas (Ollerton et al., 2011). Nesse contexto, a influência dos polinizadores na produção agrícola é indiscutível, o qual girou em torno de US \$177,48 bilhões no mundo em 2005 (Gallai et al., 2009) e US\$ 235 bilhões a US\$ 577 bilhões em 2015 (IPBES, 2016). Já no Brasil a contribuição anual da polinização é de, aproximadamente US\$ 45 bilhões (Giannini et al., 2015b).

Apesar de sua importância, as populações e a riqueza de espécies de abelhas têm comprovadamente declinado no mundo todo (Biesmeijer et al., 2006; Dicks et al., 2021; Goulston et al., 2015; Zattara e Aizen, 2021), juntamente com outros grupos de polinizadores. Drásticas reduções populacionais vêm sendo registradas e estima-se que, aproximadamente, 40% das espécies de insetos no mundo podem ser extintas nas próximas décadas (Sánchez-Bayo e Wyckhuys, 2019). No que se refere às

abelhas, esse relato vem ocorrendo há cerca de 50 anos, com destaque para a Desordem do Colapso das Colônias (DCC) (Dainat et al., 2012; Ellis et al., 2010; Johnson, 2013; Pires et al., 2016). As causas deste fenômeno não são totalmente compreendidas. Porém, sabe-se que os agrotóxicos, juntamente com outros estressores, podem contribuir para agravar o problema (Abati et al., 2021; Dicks et al., 2021; Desneux et al., 2007; Goulson et al., 2015), pois além de contribuir para o DCC ainda podem causar a mortalidade das abelhas.

Embora a maior parte dos estudos publicados até o momento tenham como foco a toxicidade de inseticidas sobre as populações de abelhas (Blacquièrre e Steen, 2017; Herbert et al., 2014; Lima et al., 2016), investigações sobre os efeitos de herbicidas, como o GLY e atrazina, têm também demonstrado que tais agrotóxicos podem afetar a sobrevivência ou ter outros efeitos indesejáveis à saúde destes insetos (Battisti et al., 2021; Belsky e Joshi, 2020; Nocelli et al., 2019). Preocupante também é o fato de que soluções de água com açúcar contendo glifosato em determinada concentração (10 ppb) se mostraram mais atrativas às abelhas do que soluções sem este herbicida, quando considera-se a possibilidade de contaminação do néctar na natureza (Liao et al., 2017). Além disto, assim como outros herbicidas, o GLY e seus formulados também podem afetar as abelhas indiretamente, devido à redução dos recursos alimentares destas, quando reduz a diversidade de plantas no entorno das plantações (Johnson, 2015), contribuindo para impactos negativos adicionais sobre as populações destes polinizadores.

Em contato com as plantas, o GLY é rapidamente absorvido pela superfície das folhas e caulículos, sendo difundido através da cutícula (Amarante Junior et al., 2002; Kirkwood et al., 2000). Quando no solo, é absorvido e degradado pela microbiota presente neste. Uma das vias conhecidas de degradação do GLY, envolve sua transformação em glioxilato e ácido aminometilfosfônico (AMPA), por ação da enzima oxidoreductase, sendo uma boa parte deste produto consumido pelos microrganismos (Ledoux et al., 2020; Pollegioni et al., 2011). Além disso, pode ser transformado em fosfato inorgânico e sarcosina pela enzima C-P liase (Dick e Quinn, 1995; Ledoux et al., 2020). Esta degradação normalmente é lenta, com uma meia vida que pode variar entre dias e alguns meses (Giesy et al., 2000; Gill et al., 2018).

Nessa perspectiva, até pouco tempo atrás, o risco da persistência deste princípio ativo no ambiente era considerado baixo. Entretanto, evidências sugerem que o GLY pode permanecer por mais tempo do que se pensava no ambiente, isto

porque a aplicação de produtos à base de glifosato tornou-se prática comum, possibilitando o acúmulo deste herbicida, ou de seus metabólitos, nos ecossistemas, principalmente em períodos de seca (Battisti et al., 2021; Brovini et al., 2021; De Andréa et al., 2003; Ledoux et al., 2020; Marques et al., 2021; Richmond, 2018). Por exemplo, amostras de mel de cinco estados brasileiros possuíam níveis de GLY e AMPA acima do limite permitido pela legislação ( $0,05 \mu\text{g/g}^{-1}$ ), onde também foi registrado perdas de colônias de abelhas e uso frequente de GLY formulado na agricultura (Souza et al., 2021).

Em tal contexto, a preocupação em relação a contaminação das abelhas com GLY aumentou nos últimos anos, tendo em vista a importância deste grupo tão importante de polinizadores. Por serem insetos dependentes das angiospermas para sua alimentação (Michener, 2007), sem dúvida alguma, as abelhas estão entre os organismos mais expostos aos produtos à base de GLY. Uma meta-análise publicada recentemente demonstrou que o GLY e suas formulações podem ser letais a diversas espécies de abelhas, seja por contaminação oral, contato ou pulverização (Battisti et al., 2021). Contudo, a mortalidade das abelhas é apenas um dos problemas imediatos causados por este herbicida. Não se pode descartar o risco do comprometimento da saúde das abelhas, quando estas são expostas, em longo prazo, a doses subletais do GLY, mas que são ecologicamente relevantes, pela persistência deste herbicida no ambiente e ou ainda nos recursos armazenados no interior dos ninhos, como já demonstrado (El Agrebi et al., 2020; Souza et al., 2021; Zhu et al., 2017a, 2017b). Além do mais, as doses subletais testadas em diferentes estudos (Jumarie et al., 2017; Vázquez et al., 2018) são as recomendadas pelos fabricantes.

Nessa perspectiva, nos últimos anos, vários estudos buscaram avaliar os efeitos tóxicos subletais do GLY em diferentes espécies de abelhas, mas sobretudo em *Apis mellifera* L. Tais efeitos são decorrentes da utilização de doses que não causam a morte, mas desencadeiam alterações bioquímicas, celulares, morfofisiológicas, imunológicas, no desenvolvimento, longevidade, fecundidade e razão sexual nos organismos (Boily et al., 2013; Desneux et al., 2007; Gill et al., 2018). Além disso, doses subletais do GLY e suas diferentes formulações podem reduzir a diversidade da microbiota intestinal e a taxa de sobrevivência da ninhada, prejudicar a aprendizagem associativa e a memória recente dos adultos, interferir na orientação das abelhas no campo, entre outros tantos fatores que contribuem para o desequilíbrio funcional adequado da colônia (Balbuena et al., 2015; Dai et al., 2018; Helmer et al.,

2015; Motta et al., 2020; Motta e Moran, 2020; Vázquez et al., 2018). Assim, diante da importância do tema e considerando-se a rápida velocidade com que as evidências se acumulam na literatura, esta revisão visa fazer uma compilação exclusivamente dos resultados obtidos até o momento acerca dos efeitos subletais do herbicida glifosato e suas diferentes formulações em abelhas, com ênfase para a espécie *A. mellifera*.

### 3.2 VIAS DE CONTAMINAÇÃO DAS ABELHAS PELO GLIFOSATO E SEUS FORMULADOS

As abelhas podem ser expostas ao GLY por diferentes formas. A contaminação por via oral (pólen e néctar contaminados), talvez seja uma das formas mais relevantes, pois pode ocorrer tanto fora do ninho quanto no interior deste (Sánchez-Bayo e Goka, 2016). Além disso, a água trazida para o interior das colmeias, ou gotículas de água liberadas por gutação, de plantas que foram contaminadas com GLY, podem ser outras fontes de contaminação (Dai et al., 2018; Motta et al., 2020). No campo, as abelhas podem se contaminar com o GLY no momento da pulverização, ou ao entrar em contato com plantas contaminadas durante o forrageamento (Abraham et al., 2018; Johnson, 2015).

Após a contaminação, se não houver a mortalidade, as abelhas podem levar o GLY até as larvas dentro dos ninhos (Lehmann e Camp, 2021; Rosanigo et al., 2020) e colmeias (Motta et al., 2020; Motta e Moran, 2020), podendo, prejudicar o desenvolvimento da cria via alimentação (Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2018, 2020b). Além do mais, o GLY pode persistir por até 170 dias em matrizes como água e mel, mas sobretudo, considera-se as propriedades antimicrobianas do mel que podem inibir a degradação do GLY via microrganismos (Israili, 2014; Odemer et al., 2020).

### 3.3 EFEITOS SUBLETAIS DO GLIFOSATO EM ABELHAS

Foi realizada uma busca criteriosa nos indexadores “Web of Science” (<http://www.webofscience.com>), Periódicos CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil) (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>) and

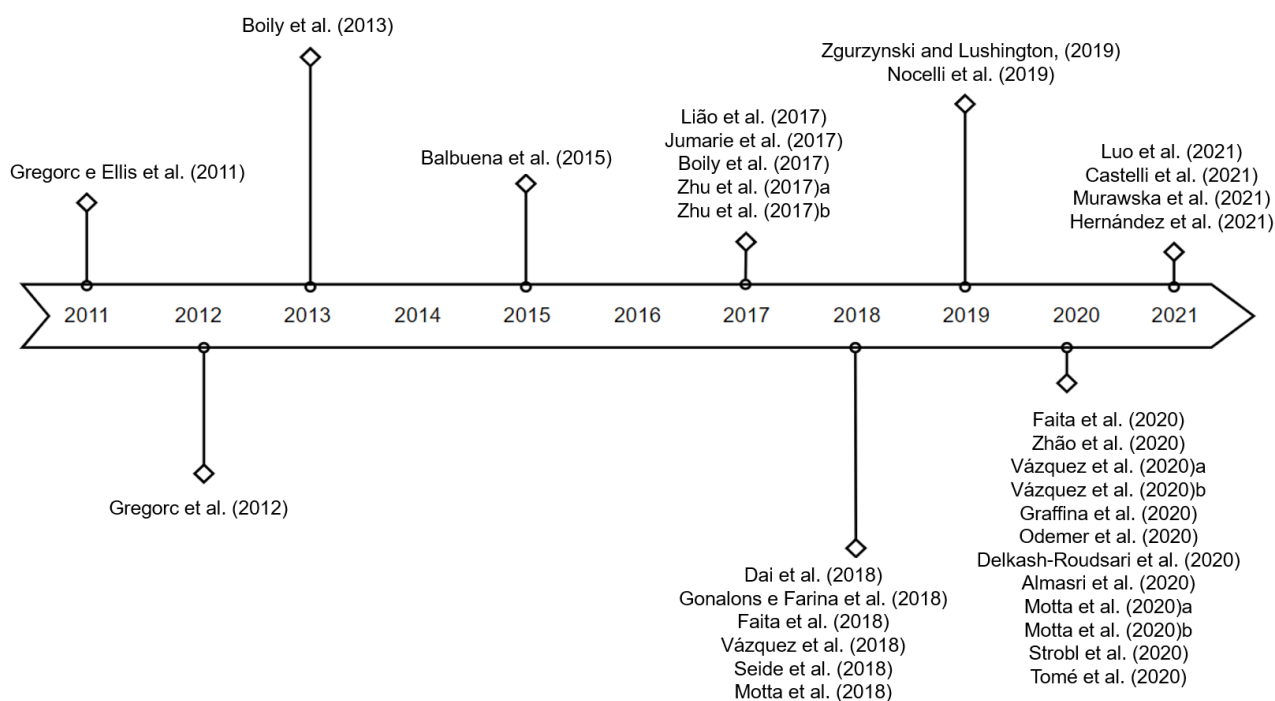
PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e Google Scholar. O script booleano utilizado foi “Glyphosate” AND “bees”, a fim de selecionar os artigos que avaliaram efeitos subletais causados pelo GLY (puro ou formulado) em abelhas, publicados até setembro de 2021. No total, foram encontrados 33 artigos que avaliaram efeitos subletais, dos quais 26 também avaliaram efeitos letais (Figura 1). todos publicados na última década, ou seja, de 2011 a 2021 (Figura 2).



**Figura 1:** Artigos que avaliaram os efeitos subletais do GLY puro ou formulado em abelhas, publicados até setembro de 2021. A) Percentual de artigos que utilizaram *Apis* spp. e não *Apis* spp. como organismos modelo. (B) Percentual de investigações

(experimentos) com os diferentes efeitos subletais avaliados nos 33 artigos publicados. (C) Número de artigos com o ciclo de vida (adultos e larvas), formas de exposição (ingestão e tópica), tempo de exposição (crônica e aguda) e forma de avaliação (letal ou subletal).

Fonte Autores.

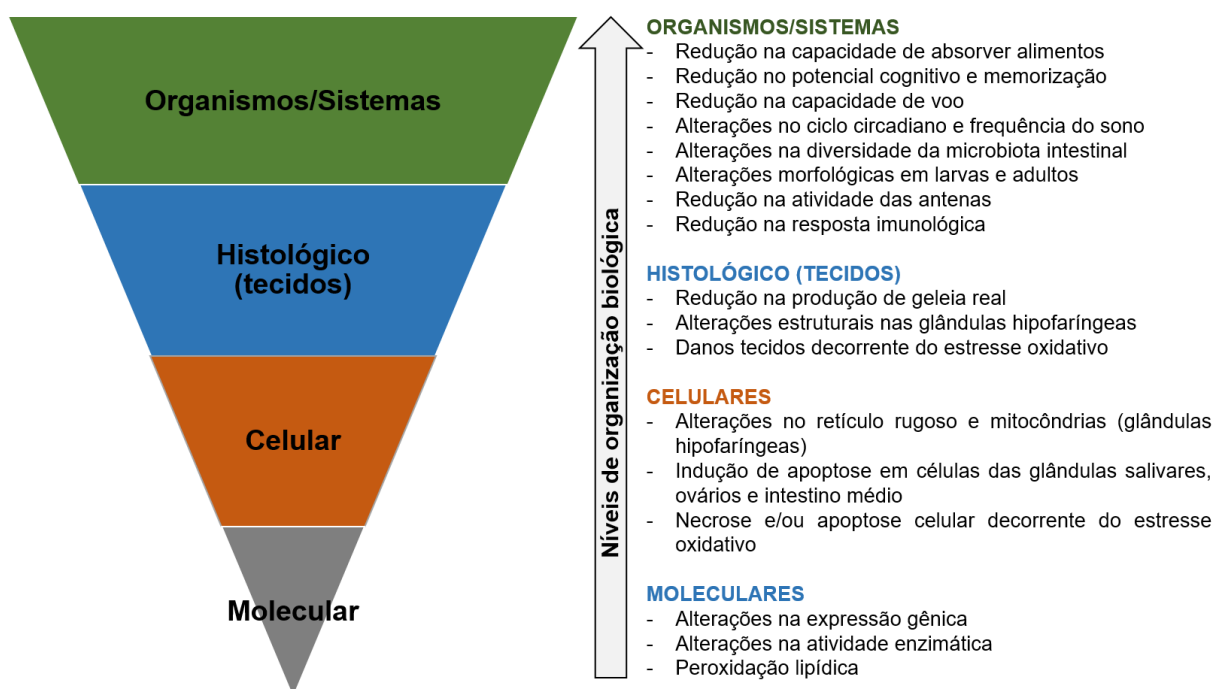


**Figura 2:** Linha do tempo com os artigos publicados e avaliados por pares, que investigaram os efeitos subletais do GLY, puro ou formulado, em abelhas solitárias e sociais, nas fases de larva/adulto.

Fonte: Autores.

Os resultados obtidos a partir da pesquisa realizada demonstram, claramente, que a exposição (aguda e crônica, de larvas e adultos) de diferentes espécies de abelhas (sociais e solitárias) ao GLY puro ou formulado pode desencadear alterações ao nível molecular, celular, histológico e sistêmico/organismo (Figura 3). Até o presente, o conjunto de bioensaios realizados avaliaram alterações na expressão gênica e funcionamento enzimático, metabolismo oxidativo (peroxidação lipídica), estrutura de células/tecidos, diversidade da microbiota intestinal, aprendizagem, consumo de alimentos, capacidade de voo, deslocamento vertical, ciclo circadiano e desenvolvimento corporal (Figura 1B), fatores estes que podem também, em espécies sociais, refletir na homeostase da colônia (Balbuena et al., 2015; Krimsky, 2021). Os

resultados destes estudos, com os principais marcadores avaliados na Figura 3.



**Figura 3:** Possíveis biomarcadores associados a exposição crônica ou aguda de abelhas adultas ou larvas ao GLY e suas formulações.

Fonte: Autores.

### 3.3.1 Alterações moleculares: efeitos do GLY e seus formulados na expressão gênica e atividade enzimática

Uma gama vasta de biomarcadores estão disponíveis para avaliar a toxicidade de agrotóxicos, como o GLY e seus formulados, em organismos não-alvo (Oost et al., 2003). A partir de alguns biomarcadores pode-se avaliar danos causados nos menores níveis da organização biológica, como por exemplo, molecular e celular, e muitas vezes antecipar mudanças em níveis superiores, como organismo, população ou comunidade (Cajaraville et al., 2000; Oost et al., 2003). No que se refere as abelhas, todos os estudos que avaliaram os efeitos subletais do GLY e suas formulações no nível molecular foram publicados na última década, com a espécie *A. mellifera* sendo o foco principal destas publicações, como representado na tabela 1 e figura 2.

**Tabela 1:** Efeitos subletais causados pela exposição das abelhas ao GLY puro ou formulações, espécies, estágio de vida, vias de exposição e tempo de exposição dos 33 artigos encontrados até setembro de 2021.

EFEITOS SUBLETAIS EM ABELHAS	ESPÉCIE	C.B <sup>1</sup>	VIAS DE EXPOSIÇÃO	<sup>2</sup> T	<sup>3</sup> CONC.	<sup>4</sup> CONC. (mg/L)	REFERÊNCIA
<b>Alterações moleculares e celulares</b>							
- Redução na expressão de vários genes relacionados a desintoxicação. Os principais genes são CYP9Q2, CYP9Q3, CY4G11 e CYP6AS3, CYP6AS4 – sintetizam enzimas do complexo citocromo P450. - Regula negativamente genes relacionados a imunidade das larvas de <i>A. mellifera</i> . O principal é o gene <i>Abaecin</i> .	<i>Apis mellifera</i>	Larva/Adulto	Alimentação	240	0,8 µg/L / 54 µg/L	0,0008 mg/L / 0,054 mg/L	Tomé et al., 2020
	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	204	200 ppm	200 mg/L	Gregorc et al., 2012
	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	120	2,5 mg/L	2,5 mg/L	Vázquez et al., 2020b
- Desenvolvimento de problemas nos sistemas imunológicos, digestivo, nervoso, metabolismo (aminoácidos e carboidratos) decorrente de alterações na expressão de 86 genes da amostra AccGCF3d/AccUnt3d e 141 genes da Amostra AccGCF5d/AccUnt5d	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	72 e 120	6,7 mL/L	6700 mg/L	Zhao et al., 2020
- Desenvolvimento de problemas nos sistemas imunológicos, digestivo, nervoso, metabolismo (aminoácidos e carboidratos) decorrente de alterações na expressão de 319 genes da amostra n AccGCF3d/AccUnt3d e 338 genes da amostra AccGCF5d/AccUnt5d	<i>Apis cerana</i>	Adulto	Alimentação	72 e 120	1mL/150mL	6700 mg/L	Zhao et al., 2020
- Aumento no nível de expressão de enzimas imunológicas. As principais foram: isozima e enzima glicose oxidases.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	24	10 mg/L	10 mg/L	Castelli et al., 2021
- Redução anormal nos níveis das enzimas Invertase e fenoxidase.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	168 e 336	93614 mg/L	93614 mg/L	Zhu et al., 2017a
- Redução anormal no nível da enzima	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Pulverização	48	2500 mg/L	2500 mg/L	Zhu et al., 2017b

acetilcolinesterase.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação				Boily et al., 2013
- Aumento anormal na atividade da acetilcolinesterase e glutatona S-transferase após 20 dias.							
- Diminuição anormal da glicose-6-fosfato desidrogenase após dez dias	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	240 e 480	1 ppb	0,001 mg/L	Murawska et al., 2021
- Alterações estruturais nas glândulas hipofaríngeas (degeneração precoce do retículo endoplasmático rugoso e alterações nas mitocôndrias)	<i>Apis mellifera</i>	Adultos	Alimentação	24	360 g/L	3,6 x 10 <sup>5</sup> mg/L	Faita et al., 2018
- Redução na produção de geleia real decorrente de alterações nas células da glândula hipofaríngea.	<i>Apis mellifera</i>	Adultos	Alimentação	72	6,68 mg.L <sup>-1</sup>	6,68 mg/L	Chaves et al., 2020
- Envelhecimento e redução glandular hipofaríngea (núcleo reduzido e citoplasma irregular).	<i>Apis mellifera</i>	Larva/Adulto	Alimentação	240	0,8 µg/L / 54 µg/L	0,0008 mg/L / 0,054 mg/L	Tomé et al., 2020
- Indução de apoptose das células do intestino médio, glândulas salivares e ovários.	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	132	400 ppm	400 mg/L	Gregorc e Ellis, 2011
- Alterações no metabolismo oxidativo (peroxidação lipídica).	<i>Apis mellifera</i>	Adultos	Alimentação	240	0,12 mg/L	0,12 µg/L	Jumarie et al., 2017
<b>Alterações na microbiota intestinal</b>							
	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	-	0.21 g/kg	210 mg/L	Blot et al., 2019
- Alterações na diversidade dos principais táxons de microrganismos do tubo digestório.	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	-	4 mg/L	4 mg/L	Dai et al., 2018
Principais espécies impactadas: <i>Snodgrassella alvi</i> , <i>Gilliamella apícola</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> Firm-4 , <i>Lactobacillus</i> Firm-5 e <i>Snodgrassella</i> sp.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	24	10 mg/L	10 mg/L	Castelli et al., 2021
	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação/pulverização	124	20 mg/L, 169,1 g / mol e 540 g/L	20 mg/L, 169,1 mg/L e 5,4 x 10 <sup>5</sup> mg/L	Motta et al., 2020, 2018; Motta and Moran, 2020
<b>Alterações na aprendizagem e comportamento</b>							
- Redução na capacidade de absorver alimentos				120,			
- Redução na capacidade de resposta a sacarose e água	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	216 e 336	2,5 mg/L	2,5 mg/L	Gonalons e Farina, 2018
- Efeito negativo na aprendizagem olfativa	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	-	3,6 g/L	3,56x10 <sup>5</sup> mg/L	Luo et al., 2021
- Redução na capacidade de escalada							
- Redução na capacidade de voo das campeiras	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	-	2,5, 5 e 10 mg/L	2,5, 5 e 10 mg/L	Balbuena et al., 2015
- Redução na capacidade de voo e de completar labirintos simples e complexos.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	-	100 mg/L	100 mg/L	Zgurzynski e Lushington, 2019

- Alterações no ciclo circadiano, reduzindo a atividade noturno e diurna.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	-	6 e 24 mg.L <sup>-1</sup>	6 e 24 mg/L	Delkash-Roudsari et al., 2020
- Preferência pelo consumo de alimentos contaminados com GLY.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	48	10 ppb	0,01 mg/L	Liao et al., 2017
- Redução na atividade antenal e frequência do sono.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	408	1,25, 2,5 ou 5 mg/L	1,25, 2,5 ou 5 mg/L	Vázquez et al., 2020A
- Redução na capacidade de retenção de memória.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	72	1500 ng/bee		Hernández et al., 2021
- Redução na capacidade cognitiva e capacidade de voo das fêmeas adultas.	<i>Megachile spp.</i>	Larva/Adulto	Pulverização	2880	8g/L e 16g/L	8000 mg/L e 1,6 x 10 <sup>4</sup> mg/L	Graffigna et al., 2020
<b>Alterações no desenvolvimento e fisiologia</b>							
- Atraso no desenvolvimento na ninhada de operárias.	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	Alimentação	216	4,8 e 137,6 mg/Kg	18 e 52,20 mg/L	Odemer et al., 2020
- Alteração no desenvolvimento das larvas (sobrevivência e mudas bem-sucedidas).	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	120	2,5 mg/L <sup>-1</sup> e 5 mg/L <sup>-1</sup>	2,5 mg/L <sup>-1</sup> e 5 mg/L <sup>-1</sup>	Vázquez et al., 2018
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Larva	Alimentação	240	480 g/L	4,8 x 10 <sup>5</sup> mg/L	Seide et al., 2018
- Exposições crônicas diminuem a sobrevivência da colônia	<i>Apis mellifera</i>	Larva	Alimentação	240	4 mg/L e 20 mg/L	4 mg/L e 20 mg/L	Dai et al., 2018
- Atraso no desenvolvimento das larvas e redução na emergência de adultos	<i>Megachile spp.</i>	Larva/Adulto	Pulverização	2880	8g/L e 16g/L	8000 mg/L e 1,6 x 10 <sup>4</sup> mg/L	Graffigna et al., 2020

1  
2  
3  
4

<sup>1</sup>Fase da vida

<sup>2</sup>Tempo de exposição (horas)

<sup>3</sup>Concentração utilizada (ambientalmente relevante e/ou recomendada pelos fabricantes)

<sup>4</sup>Concentração utilizada convertida µg / L.

Alguns destes trabalhos avaliaram o impacto do GLY no funcionamento de várias enzimas (Boily et al., 2013; Zhu et al., 2017b, 2017a), na expressão gênica (Gregorc e Ellis, 2011; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020b) e na origem de danos oxidativos em abelhas (Boily et al., 2013; Helmer et al., 2015). Tais estudos demonstram que, por meio de biomarcadores ao nível molecular, é possível estimar problemas fisiológicos que poderiam prejudicar a saúde das abelhas, ou ainda o funcionamento da colônia como um todo, a qual é considerada um superorganismo (Canciani et al., 2019; Wiley e Sons, 2004). No entanto, o número de publicações que até o momento avaliaram a toxicidade ao nível molecular do GLY em abelhas é ainda limitado, havendo uma necessidade evidente de mais pesquisas com foco neste tema, sobretudo também com outras espécies de abelhas. Embora a ingestão de GLY seja a principal via de contaminação das abelhas, as avaliações também incluem a exposição tópica e por pulverização, tanto em larvas quanto em abelhas adultas, principalmente de *A. mellifera*, como apresentado na tabela 2.

Expressão gênica é o processo pelo qual as informações contidas nos genes são utilizadas para formação de proteínas. Sendo assim, alterações (aumento ou diminuição) na expressão dos genes pode desequilibrar o funcionamento da célula, pela ausência, ou produção excessiva de proteínas, o que torna esse biomarcador interessante para estimar/prever futuros problemas fisiológicos na abelha, ou até mesmo, em nível de colônia (Cajaraville et al., 2000; Oost et al., 2003). Destaca-se que o genoma das abelhas é composto por 11 mil genes codificadores de proteínas, quantidade menor comparado a muitos outros insetos (Claudianos et al., 2006). Dentre os genes para os quais a expressão têm sido avaliada, estão os que codificam enzimas relacionadas a desintoxicação de xenobióticos, como as enzimas da família das glutathione-S-transferases (GSTs), as carboxil / colinesterases (CCEs) e do citocromo P450s (P450s) (Claudianos et al., 2006; Feyereisen, 1999; Gong e Diao, 2017; Yu et al., 1984), sendo as proteínas do complexo do citocromo P450 mais ativas nesse processo (Gong e Diao, 2017).

A exposição de larvas de *A. mellifera* ao GLY pode reduzir a expressão de genes relacionados com a desintoxicação, principalmente do gene CYP9Q2, responsável por sintetizar uma das enzimas do complexo citocromo P450 (Tomé et al., 2020), além de outros genes da fase I (CYP6AS3) e da fase II (sulfotransferase e UGT1-3) da biotransformação de xenobióticos (Vázquez et al., 2020b). Isso faz com

que as abelhas fiquem mais suscetíveis a outros resíduos químicos (Samsel e Seneff, 2013), gerando uma disfunção no sistema enzimático de desintoxicação e estresse oxidativo, o que pode ser um fator de risco a saúde das abelhas (Vázquez et al., 2020b).

A metabolização do GLY pelas abelhas, ou de outro produto químico gerado secundariamente, ainda não é totalmente compreendida. Embora já se saiba que genes relacionados à imunidade (gene *Abaecin* e genes que sintetizam as enzimas pacifastina, metaloproteína – MME, lisozima, glicose oxidase e vitelogenina), interação planta-herbívoro (proteína semelhante a G12), mecanismos epigenéticos (GB46620) e desintoxicação (Genes CYP6AS4 e CYP9Q3) foram modulados pelo GLY (Castelli et al., 2021; Vázquez et al., 2020b). O genoma das abelhas é caracterizado por conter um número reduzido de genes relacionados ao processo de desintoxicação ao se comparar a outros insetos, o que reflete em um maior gasto energético com mecanismos compensatórios (Chmiel et al., 2020; Claudianos et al., 2006; Gong e Diao, 2017). Sabe-se que o GLY também pode causar alterações no metabolismo energético, reduzindo a síntese de enzimas que catalisam proteínas (enzima GB49819), ácidos graxos (enzima GB40899) e aumentando a produção das proteínas de ligação ao ferro (Vázquez et al., 2020b). Os autores enfatizam a necessidade de mais estudos e concluem que alterações fisiológicas negativas na fase larval podem refletir em efeitos negativos a longo prazo em nível de população.

Além de alterações na expressão gênica na fase larval, sabe-se que a exposição das abelhas ao GLY, na fase adulta, também pode modular a expressividade de alguns genes. A exposição de *Apis* spp. ao GLY pode induzir a redução na expressão dos genes *AmGCF3d/AmUnt3d* e *AmGCF5d/AmUnt5d*, relacionados a processos metabólicos, crescimento corporal, desenvolvimento e resposta imunológica das abelhas (Zhao et al., 2020). O aumento do tempo de exposição intensifica a supressão gênica, indicando que o GLY prejudica as principais vias das abelhas de uma forma acumulativa. O número de estudos que avaliam genotoxicidade do GLY para as abelhas é baixo, e mais pesquisas são necessárias, avaliando, principalmente, outras espécies de abelhas e outras vias bioquímicas.

A alteração no funcionamento de muitas enzimas é utilizada como biomarcadores. Como exemplo, são as enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a glutathione redutase (GR) e a superóxido dismutase (SOD), bem como as colinesterases (acetilcolinesterase - AChE), a carboxilesterase (CaE), além das

glutathione-S-transferases (GSTs) e as enzimas da família do citocromos P450s, que participam de processos de sinalização, biossíntese de moléculas, mas principalmente do metabolismo de xenobióticos (Claudianos et al., 2006; Feyereisen, 1999; Gong e Diao, 2017; Hyne e Maher, 2003; Yu et al., 1984). Sabe-se que a exposição, oral e tópica, de *A. mellifera* ao Roundup não altera o funcionamento das GSTs e esterase (Zhu et al., 2017a, 2017b). No entanto, estudos que avaliaram a exposição de operárias de *A. mellifera* a concentrações/doses subletais de GLY, via alimentação e pulverização, detectaram uma redução anormal no funcionamento da enzima acetilcolinesterase (Boily et al., 2013; Zhu et al., 2017a, 2017b), sendo o impacto dessa redução não compreendido totalmente.

Sabe-se que a AChE é uma enzima que degrada a acetilcolina, neurotransmissor relacionado principalmente a atividade neuromuscular, a consolidação da memória e a cognição dos animais (Casida e Durkin, 2013; Guez et al., 2001), o que em hipótese, pode estar relacionado com a redução cognitiva e associativa das abelhas observada por Helmer et al. (2015). Além disso, tais condições também levaram a uma redução no funcionamento das enzimas invertase e fenoloxidase (Zhu et al., 2017a), importantes para hidrólise da sacarose em glicose e frutose e no mecanismo de defesa, respectivamente (Doner, 1977; González-Santoyo e Córdoba-Aguilar, 2012).

Outro biomarcador utilizado para avaliar o estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (LPO), estimada pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A LPO resulta da ação catalítica de radicais livres sobre lipídeos estruturais da membrana plasmática das células (Benzie, 1996). A exposição de operárias de *A. mellifera* a 5ng/abelha de GLY por via oral, promoveu um aumento na peroxidação lipídica, refletindo em um maior consumo de alimento (Jumarie et al., 2017), que induzindo o estresse oxidativo. A partir dos biomarcadores citados acima é possível estimar se os diversos pesticidas, inclusive os produtos à base de GLY, podem ou não, desencadear alterações na homeostase celular das abelhas.

### 3.3.2 Efeitos tóxicos do GLY e seus formulados em nível celular

A quantidade de pesquisas que avaliaram o efeito tóxico do GLY e seus formulados em nível celular nas abelhas é bem limitado. Muitos xenobióticos são

metabolizados em produtos intermediários altamente reativos, que muitas vezes são mais tóxicos que o composto original (Wiley e Sons, 2010). Esse processo é conhecido como bioativação e nos insetos pode ocorrer no intestino médio ou nos túbulos de Malpighi (Burt e Wigglesworth, 1966). Tais produtos, normalmente são eletrofílico (com centros positivos), interagindo de várias maneiras com as estruturas celulares, através de ligações com macromoléculas, estimulando a peroxidação lipídica ou formando espécies reativas de oxigênio. Sendo assim capazes de causar danos a macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) e membranas celulares (Wiley e Sons, 2010), o que pode desencadear necrose e/ou apoptose celular, até mesmo danos teciduais (Barbosa et al., 2010; Robertis e Hib, 2017; Silva et al., 2015)

Larvas de *A. mellifera* expostas ao GLY na concentração de 400 mg/L (400 ppm) por 132 horas, tiveram quebras no DNA e, conseqüentemente, indução de apoptose em células do intestino médio, glândulas salivares e ovários (Gregorc e Ellis, 2011). Nessa perspectiva, Herbert et al. (2014) identificaram a expressão de um gene de sinalização apoptótica, o gene SMPD1, em lavas alimentadas com GLY. Além do mais, a alimentação de abelhas adultas (*A. mellifera*) com pólen contaminado com o GLY, pode causar degeneração do retículo endoplasmático rugoso em células da glândula hipofaríngea, e alteração nas cristas mitocondriais reduzindo as funções bioenergéticas, comprometendo a produção de ATP, além de reduzir o número de vesículas contendo geleia real (Faita et al., 2018), com conseqüente diminuição na produção deste alimento pela colônia (Chaves et al., 2020).

Em hipótese, considerando que a fragmentação do DNA, as alterações no retículo rugoso e a redução na produção de ATP, também ocorressem em outros tecidos corporais das abelhas (além dos estudados até o momento), o GLY teria ação direta na síntese de diversas proteínas essenciais em processos fisiológicos. Por exemplo, a produção de hormônios proteicos, proteínas estruturais (musculares, exoesqueleto, neurais, entre outras), proteínas da imunidade humoral, além de impactar no metabolismo desses tecidos. No entanto, necessita-se de novas pesquisas para compreender ainda mais o impacto do GLY nas abelhas em nível celular.

### 3.3.3 Alterações na microbiota intestinal

A microbiota intestinal das abelhas é composta por diversos microrganismos

mutualísticos, semelhante à dos mamíferos, no entanto, com menor grau de diversidade (Kwong e Moran, 2016). Existem oito táxons microbianos principais no trato digestivo das abelhas, os quais são: *Lactobacillus* spp. firma-4; *Lactobacillus* spp. firm-5 (filo Firmicutes); *Bifidobacterium* spp. (filo Actinobacteria); *Snodgrassella alvi*; *Gilliamella apicola*; *Frischella perrara*; *Bartonella apis*; *Parasaccharibacter apium*. Tais organismos são importantes para a saúde das abelhas, pois fortalecem o sistema imunológico contra agentes patogênicos, auxiliando na neutralização de toxinas e na digestão de compostos não digeridos pelas abelhas (Kwong and Moran, 2016; Motta et al., 2020). Sendo assim, decorrente do número reduzido de genes relacionados com o metabolismo de desintoxicação de xenobióticos, comparado a outros insetos, a microbiota intestinal das abelhas assume um importante papel nesse processo (Chmiel et al., 2020).

A exposição crônica de operárias de *A. mellifera*, recém emergidas, ao GLY na concentração de 20 mg/L de glifosato afetou negativamente a comunidade bacteriana do intestino das abelhas (Dai et al., 2018). Foi também demonstrado que, a exposição a um xarope contendo GLY (210 mg/L ou 0,21 g/kg), por 240 horas, desencadeou uma acentuada diminuição da espécie *S. alvi*, uma diminuição parcial de *G. apicola* e um aumento de *Lactobacillus* spp. (Blot et al., 2019). Da mesma forma, o GLY nas concentrações de 1,69 mg/L (0,01 mM) a 169,1 mg/L (1,0 mM), diminuiu a diversidade de *Gilliamella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* Firm-4 e *Lactobacillus* Firm-5 e *S. alvi*, independentemente do período de exposição ou idade das abelhas, em estudos de campo ou laboratório (Motta et al., 2020; Motta e Moran, 2020). Castelli et al. (2021) também observaram alterações na microbiota intestinal de *A. mellifera* quando tratadas com dose realística de campo (10 mg/L de GLY), principalmente, diminuindo a abundância de *S. alvi*.

*Snodgrassella alvi* é uma bactéria gram-negativa, responsável por formar um biofilme na parede intestinal das abelhas, facilitando a colonização de outras bactérias, além de ser um fator de proteção (Motta et al., 2020; Motta e Moran, 2020). Como já enfatizado, a microbiota intestinal é extremamente importante para a saúde do hospedeiro, pois são responsáveis por várias funções, produzindo substâncias utilizadas pelo hospedeiro (Engel e Moran, 2013). A redução na biodiversidade da microbiota intestinal de abelhas pode prejudicar o desempenho na modulação da imunidade, influenciando negativamente a saúde destes animais e deixando-as mais suscetíveis a patógenos (Kwong et al., 2017). Além do mais, foi demonstrado que a

biodiversidade intestinal está relacionada ao comportamento e capacidade de cognição dos animais (Chmiel et al., 2020; Kwong e Moran, 2016; Mackos et al., 2016). Fatores que podem estar relacionados com os efeitos subletais descritos a seguir.

#### 3.3.4 Alterações na aprendizagem e comportamento

Muitas espécies de abelhas são sociais e contam com uma alta capacidade cognitiva, capaz de associar e responder a estímulos ambientais bem como as necessidades da colônia, principalmente as campeiras, que podem criar memórias de recursos encontrados a uma distância de até 6 km da colmeia (Chmiel et al., 2020; Couvillon et al., 2015; Hagler et al., 2011). Os agrotóxicos podem reduzir essa capacidade cognitiva, além de causar alterações comportamentais nas abelhas, o que pode comprometer o funcionamento da colônia como um todo (Chmiel et al., 2020).

Sabe-se que a exposição ao GLY pode alterar o ciclo circadiano de *A. mellifera* (Vázquez et al., 2020b), as quais possuem três estágios de sono, que se repetem várias vezes, em períodos que variam entre 10 a 15 minutos no caso das campeiras (Eban-Rothschild e Bloch, 2008). Não dormindo o suficiente, as operárias tendem a reduzir a capacidade de aprendizagem/memorização e habilidade de escalada, prejudicando tarefas essenciais para a manutenção da colônia (Luo et al., 2021; Vázquez et al., 2020a). Além disso, durante o forrageamento, as abelhas podem tomar decisões baseadas em informações memorizadas previamente, assim a exposição crônica ao GLY pode impactar negativamente a coordenação das atividades de forrageamento, além de prejudicar a capacidade de voo, as quais podem não retornar para a colmeia (Abraham et al., 2018; Luo et al., 2021). Além do mais, com isso, o sucesso de polinização pode ser comprometido (Seide et al., 2018).

A exposição alimentar de operárias de *A. mellifera* a doses subletais de GLY (50 ng/abelha), nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5 mg/L, causa hipoatividade das antenas e diminuição da frequência do sono (Vázquez et al., 2020a), além de alterar o ciclo circadiano, reduzindo a atividade noturna e diurna (Delkash-Roudsari et al., 2020). O sono é responsável pela regulação homeostática dos animais, assim, o GLY possivelmente afetou a profundidade do sono das abelhas, o que está relacionado a consolidação de memória (Beyaert et al., 2012; Vázquez et al., 2020a). Isso foi observado no caso de operárias adultas de *A. mellifera* que foram expostas cronicamente ao GLY, via alimentação, e apresentaram baixo desempenho de

aprendizagem olfativa. Além disso, tiveram redução na sensibilidade ao néctar, responsividade a sacarose e consumo de alimentos (Gonalons e Farina, 2018; Helmer et al., 2015; Herbert et al., 2014; Luo et al., 2021).

Já a exposição aguda ao GLY pode afetar negativamente a retenção de memória recente e o desempenho de aprendizagem (Helmer et al., 2015), além de reduzir a capacidade de extensão da probóscide a água e sacarose quando expostas por três horas ao GLY (Luo et al., 2021). Tais fatores podem prejudicar a capacidade das abelhas retornarem à colmeia, o que foi observado quando operárias adultas (campeiras) de *A. mellifera* foram expostas a três concentrações subletais de GLY (0,125, 0,250 e 0,500 µg/abelha). Durante o retorno para a colmeia, essas abelhas apresentaram voos indiretos, mudando de direção frequentemente. Isso mostra que o GLY pode modificar o comportamento de forrageamento das abelhas (Balbuena et al., 2015). Além do mais, em experimentos de voo livre de semi-campo, com oportunidade de escolher alimentos contaminados ou não, as abelhas tiveram preferência em uma concentração específica de GLY, ficando ainda mais suscetíveis a este princípio ativo (Liao et al., 2017). Diante desses resultados, os autores enfatizam a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

Na mesma perspectiva, foi observado por Zgurzynski e Lushington (2019) que a intoxicação de *A. mellifera* com doses subletais de GLY reduziu a capacidade das abelhas completarem labirintos simples e complexos. Possíveis problemas de voo também foram relatados por Graffigna et al. (2020) para abelhas solitárias silvestres *Megachile* spp., em um estudo no qual 480 ninhos-armadilhas de madeiras foram expostos à pulverização pelo GLY e à água (controle), em agroecossistemas sem atividade agrícola. Foi observado que o número de células com larvas por ninho e a sobrevivência da ninhada foi significativamente menor em ninhos contaminados com GLY (Graffigna et al., 2020). Neste caso, contudo, os autores atribuem o resultado à uma possível redução na capacidade cognitiva destas abelhas, com diminuição da integração de informações espaciais, com consequente prejuízo do forrageamento e retorno de fêmeas ao ninho; como consequência a capacidade de nidificação das fêmeas foi impactada negativamente (Graffigna et al., 2020).

Além da capacidade de voo, foi demonstrado que para um formulado comercial do GLY pode comprometer a capacidade de escalada (Luo et al., 2021). De acordo com o estudo, após 11 dias de exposição ao GLY, adultos de *A. mellifera* tiveram a capacidade de escalada comprometida, sendo observado que as abelhas expostas

ao herbicida demoraram um maior tempo para percorrer uma distância de 50 cm, em comparação com as abelhas não expostas ao produto. Atividades como escalada e a capacidade de aprendizagem das abelhas determinam o sucesso da execução de suas funções na colônia e fora dela. Por este motivo, a redução na capacidade de escalada pode prejudicar o deslocamento da abelha dentro da colônia, ou até mesmo prejudicar o retorno das campeiras do campo para a colmeia, visto que ao sair em busca de recursos, elas precisam demarcar o caminho percorrido para o retorno.

### 3.3.5 Alterações no desenvolvimento

Alterações fisiológicas podem refletir em problemas no desenvolvimento de larvas e adultos das abelhas. O gasto excessivo de energia, problemas estruturais em células/tecidos, alterações na expressão de genes e funcionamento de enzimas, como citado anteriormente, oscilam a homeostase do organismo, pois os recursos energéticos que seriam utilizados para o crescimento corporal são gastos para reparar os danos (Li et al., 2007; Vázquez et al., 2018). Os agrotóxicos podem causar problemas no desenvolvimento das abelhas, retardando o ciclo biológico, reduzindo o peso corporal e incidência de ecdises (Chmiel et al., 2020).

Larvas de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae) tratadas com alimento contaminado com GLY a  $4,8 \times 10^5$  mg/L (480 g/L e 140  $\mu$ L/abelha), por 240h, tiveram atraso no desenvolvimento, além de alta porcentagem de mortalidade em poucos dias de exposição, sendo considerado, pelos autores, mais tóxico que o imidacloprido para esta abelha (Seide et al., 2018), sendo suscetível ao GLY. Além do mais, larvas de *A. mellifera* alimentadas com GLY, por 120h, apresentaram retardo durante o desenvolvimento, realizando mudas incompletas e mal sucedidas (Vázquez et al., 2020b). Problemas no desenvolvimento também foi observado em abelhas solitárias selvagens. Para as espécies de *Megachile (Pesudocentron) gomphrenoides* Mitchell, 1933 (Hymenoptera: Megachilidae) e *Megachile (Dactylomegachile) sp.* Mitchell, 1943 (Hymenoptera: Megachilidae), o desenvolvimento das larvas e a sobrevivência de estágios imaturos foi quatro vezes menor em ninhos contaminados com GLY (Graffigna et al., 2020).

Em estudo de campo, quando o GLY foi fornecido a colônias de *A. mellifera* em concentrações subletais (18 mg/L 52,20 mg/L), por 21 dias, observou-se atraso significativo no desenvolvimento da ninhada de operárias (Odemer et al., 2020). A

ativação de um mecanismo compensatório do estresse causado por agrotóxicos, inclusive o GLY, induz um alto consumo de energia, podendo interromper o processo de muda ou atrasar o desenvolvimento, ocasionando efeitos negativos a longo prazo nas populações de abelhas (Li et al., 2007; Orr et al., 2020; Vázquez et al., 2018).

### 3.3.6 Alterações na imunidade das abelhas

A imunidade individual das abelhas é composta pela resposta imune inata (Larsen et al., 2019), a qual pode ser dividida em barreiras físicas, imunidade celular e humoral (Chmiel et al., 2020; Larsen et al., 2019). As barreiras físicas são representadas pelo exoesqueleto, os tubos traqueais e a mucosa intestinal (Larsen et al., 2019). A imunidade celular é realizada pelos hemócitos, células responsáveis pela fagocitose, encapsulação e melanização de corpos estranhos, ou pela produção das espécies reativas de oxigênio, que neutralizam substâncias indesejáveis (Chmiel et al., 2020; Larsen et al., 2019; Negri et al., 2016). Já a resposta imunológica humoral é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), acionando a produção de antimicrobianos (AMPs) por quatro vias imunes diferentes (Chmiel et al., 2020), cujo objetivo é a neutralização de substâncias.

Sabe-se que os agrotóxicos podem impactar negativamente a imunidade individual das abelhas (Chmiel et al., 2020). No caso do GLY, como citado na sessão de biomarcadores moleculares, a exposição crônica, por via alimentar, de larvas e adultos de *A. mellifera* e adultos de *A. cerana*, pode alterar a expressividade de vários genes envolvidos com o processo imunológico, além de alterar o funcionamento de enzimas imunológicas (Castelli et al., 2021; Vázquez et al., 2020b; Zhao et al., 2020; Zhu et al., 2017a). Em tal contexto, alterações na expressão gênica e no funcionamento enzimático (genes e enzimas relacionados ao processo imunológico), reduzem diretamente a eficiência imunológica das abelhas, o que gera um impacto negativo na saúde, podendo acarretar a morte destes animais ou deixá-las mais suscetíveis a outros estressores.

A microbiota intestinal, que vive em mutualismo com as abelhas, é um fator de extrema importância para a saúde desses animais, estando diretamente envolvida no processo imunológico (Kwong et al., 2017). Os autores enfatizam que a microbiota intestinal de *A. mellifera* podem induzir a expressão de AMPs, um componente crucial

da imunidade inata dos insetos. Além do mais, *A. mellifera* regulam positivamente a expressão gênica dos AMPs, apidaecina e himenoptaecina no tecido intestinal quando a microbiota está presente. Como citado na sessão sobre “alterações na microbiota intestinal”, estes microrganismos fortalecem o sistema imunológico das abelhas contra patógenos e xenobióticos (Kwong and Moran, 2016; Motta et al., 2020), visto que o número de genes relacionados a imunidade e desintoxicação de xenobióticos é reduzido, quando comparado a outros insetos (Claudianos et al., 2006; Chmiel et al., 2020).

Além da imunidade individual, as abelhas sociais desenvolveram uma “imunidade social”, a qual é uma forma de resposta imune coletiva contra patógenos e agrotóxicos, sendo exercida pela ação coletiva dos membros da colônia (Cremer et al., 2007; Chmiel et al., 2020). As principais formas de imunidade social são: (1) Febre social, que ocorre através da geração adicional de calor no interior do ninho; (2) Auto-limpeza ou “grooming” e limpeza mútua ou “mutual-grooming”, cujo objetivo é a retirada de patógenos e substâncias tóxicas da superfície do corpo; (3) Comportamento higiênico, que ocorre pela detecção e retirada da colônia de indivíduos doentes ou infectados; (4) Afastamento dos indivíduos infectados; (5) Canibalismo da prole, o qual ocorre em situações extremas, como falta de comida ou mudança acentuada na temperatura (Chmiel et al., 2020; Larsen et al., 2017).

Sabe-se muito pouco sobre os efeitos subletais do GLY diretamente na imunidade social das abelhas. Um estudo recente mostrou que a presença do GLY formulado na alimentação de *A. mellifera* pode interferir na composição proteica da geleia real, prejudicando a nutrição e a imunidade social destes animais (Faita et al., 2022). No entanto, existe uma necessidade notável de novos estudos que visem elucidar as formas de impacto dos produtos à base de GLY nesse mecanismo de imunidade das abelhas.

### 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A toxicidade do GLY, em abelhas, ainda é um tema pouco estudado, visto a importância destes animais. Como citado anteriormente, efeitos letais da exposição de diversas espécies de abelhas a formulações de GLY foram relatados nos últimos anos (Abraham et al., 2018; Battisti et al., 2021; Dai et al., 2018; Graffigna et al., 2020; Nocelli et al., 2019; Seide et al., 2018). Além disso, pesquisas têm mostrado que

mesmo não causando a morte das abelhas, os produtos à base de GLY podem impactar a saúde destes insetos, gerando efeitos subletais como alterações moleculares e celulares (Vázquez et al., 2020b; Zhu et al., 2017a), na microbiota intestinal (Blot et al., 2019; Motta et al., 2020), no comportamento/aprendizagem (Abraham et al., 2018; Luo et al., 2021), no desenvolvimento e na fisiologia (Odemer et al., 2020; Seide et al., 2018).

Danos no DNA, alterações significativas na expressão gênica e no funcionamento enzimático, redução na biodiversidade da microbiota intestinal, possivelmente causam mudanças fisiológicas nas abelhas, desequilibrando a homeostase. Além de problemas no desenvolvimento corporal, tais mudanças podem levar a uma redução na síntese de proteínas e hormônios, diminuir a capacidade de defesa, causar danos estruturais e até mesmo leva-las a gastar uma quantidade excessiva de energia, principalmente quando associados a danos estruturais em diversas células corporais. Nesse contexto, o comportamento e aprendizagem das abelhas podem ser comprometidos, resultando em problemas na consolidação da memória (curto e longo prazo) e na aprendizagem olfativa, prejudicando o voo, sucesso na polinização, capacidade de escalada e navegação. O que podemos relacionar com a exposição das abelhas ao GLY, considerando *A. mellifera* como modelo.

Assim, juntamente com outros estressores, o GLY pode estar relacionado com o declínio populacional das abelhas. Evidências mostram que o GLY e suas diferentes formulações podem causar efeitos subletais nas abelhas em nível de organismo e de colônia, embora neste último caso as informações ainda são fragmentárias. No entanto, é notável a necessidade de mais pesquisas que avaliem os efeitos do GLY em abelhas, principalmente de GLY formulado, visando compreender todas as possíveis interações e danos que o GLY pode causar nas diferentes espécies de abelhas, especialmente se considerarmos a presença dos surfactantes nas formulações comerciais, os quais têm também se mostrado tóxicos para outros animais.

Por fim, esta revisão revela ainda a escassez de estudos sobre os efeitos do GLY e seus formulados na homeostase da colônia, sendo, portanto, maiores esforços na tentativa de preencher esta lacuna no conhecimento atual um tema tão relevante. A maior parte dos artigos publicados nos últimos anos é com abelhas operárias do gênero *Apis* sp., sendo necessários explorar a ação do GLY sobre zangões, rainhas

e abelhas silvestres a partir dos diversos biomarcadores descritos no presente artigo.

#### 4 REFERÊNCIAS

- Abati, R., Sampaio, A. R., Mendes, R., Maciel, A., Colombo, F. C., Libardoni, G., Battisti, L., Lozano, E. R., Ghisi, N. D. C., Costa-maia, F. M., & Potrich, M. (2021). *Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>
- Abraham, J., Benhotons, G. S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., & Abraham, J. D. (2018). Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(8), 695–702. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2021). *Relatórios de Produtos Formulados*. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- Allen-wardell, A. G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Cox, P. A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., Inouye, D., Jones, C. E., Kennedy, K., Kevan, P., Medellin, R., Medellin-morales, S., Nabhan, G. P., Pavlik, B., Tepedino, V., ... Walker, S. (1998). *The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields*. 12(1), 8–17.
- Amarante Junior, O. P., Dos Santos, T. C. R., Brito, N. M., & Ribeiro, M. L. (2002). Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quimica Nova*, 25(4), 589–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400014>
- Balbuena, M. S., Tison, L., Hahn, M. L., Greggers, U., Menzel, R., & Farina, W. M. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*, 218(17), 2799–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, 23(4), 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A. R., de Castilhos Ghisi, N., Costa-Maia, F. M., Abati, R., dos Reis Martinez, C. B., & Sofia, S. H. (2021). Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Science of The Total Environment*, 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>
- Belsky, J., & Joshi, N. K. (2020). Effects of Fungicide and Herbicide Chemical

- Exposure on Apis and Non-Apis Bees in Agricultural Landscape. *Frontiers in Environmental Science*, 8(July). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Food Sciences and Nutrition*, 47, 233–261.
- Beringer, J. (2019). O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Revista Eletrônica Científica da UERGS*, 5(1), 18–27. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>
- Beyaert, L., Greggers, U., & Menzel, R. (2012). Honeybees consolidate navigation memory during Sleep. *Journal of Experimental Biology*, 215(22), 3981–3988. <https://doi.org/10.1242/jeb.075499>
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C. D., Settele, J., & Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Blacquièrre, T., & van der Steen, J. J. M. (2017). Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Management Science*, 73(7), 1299–1304. <https://doi.org/10.1002/ps.4583>
- Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., & Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS ONE*, 14(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>
- Bombardi, L. M. (2017). *Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia*.
- Brovini, E. M., de Deus, B. C. T., Vilas-Boas, J. A., Quadra, G. R., Carvalho, L., Mendonça, R. F., Pereira, R. de O., & Cardoso, S. J. (2021). Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks.

- Science of the Total Environment*, 771.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>
- Burt, E. T., & Wigglesworth, V. B. (1966). The principles of insect physiology. In *The Journal of Animal Ecology* (Vol. 35, Número 3). <https://doi.org/10.2307/2496>
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2–3), 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Canciani, M., Arnellos, A., & Moreno, A. (2019). Revising the superorganism: An organizational approach to complex eusociality. *Frontiers in Psychology*, 10(December). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02653>
- Carraschi, S. P., Cubo, P., Schiavetti, B. L., Shiogiri, N. S., da Cruz, C., & Pitelli, R. A. (2011). Toxic effects of phytosanitary surfactants for jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 33(2), 191–196. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v33i2.6252>
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., & Antúnez, K. (2021). Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040845>
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
- Chaves, A., Faita, M. R., Ferreira, B. L., Poltronieri, A. S., & Nodari, R. O. (2020). Effects of glyphosate-based herbicide on royal jelly production of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in field conditions. *Journal of Apicultural Research*, 60(2), 277–279. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844463>
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: A role for probiotics as mediators of environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00022>

- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R. M., Biswas, S., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., Feyereisen, R., & Oakeshott, J. G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, *15*(5), 615–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.xc>
- Couvillon, M. J., Riddell Pearce, F. C., Accleton, C., Fensome, K. A., Quah, S. K. L., Taylor, E. L., et al. (2015). A distância de forragem das abelhas depende do mês e do tipo de forragem. *Apidologie* *46*, 61–70. doi: 10.1007 / s13592-014-0302-5
- Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Wu, Y., Liu, Y., & Diao, Q. (2018). The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during arvae reared in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(29), 7786–7793. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212>
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., & Neumann, P. (2012). Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports*, *4*(1), 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
- De Andréa, M. M., Peres, T. B., Luchini, L. C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M. B., & Tedeschi Savoy, V. L. (2003). Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *38*(11), 1329–1335. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001100012>
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A. M., Goldansaz, S. H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., & Abramson, C. I. (2020). 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*(July). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J.-M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Dick, R. E., & Quinn, J. P. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *43*(3), 545–550. <https://doi.org/10.1007/BF00218464>
- Dicks, L. V., Breeze, T. D., Ngo, H. T., Senapathi, D., An, J., Aizen, M. A., Basu, P., Buchori, D., Galetto, L., Garibaldi, L. A., Gemmill-Herren, B., Howlett, B. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Johnson, S. D., Kovács-Hostyánszki, A., Kwon, Y. J., Lattorff, H. M. G., Lungharwo, T., Seymour, C. L., ... Potts, S. G. (2021). A global-

- scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Nature Ecology and Evolution*, 5(10), 1453–1461. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01534-9>
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J. L., Farmer, D., Wright, D., & Hauptfear, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. (p. 344).
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443–456. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>
- Eban-Rothschild, A. D., & Bloch, G. (2008). Differences in the sleep architecture of forager and young honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, 211(15), 2408–2416. <https://doi.org/10.1242/jeb.016915>
- El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M. L., de Graaf, D. C., & Saegerman, C. (2020). Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Science of the Total Environment*, 704, 135312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135312>
- Ellis, J. D., Evans, J. D., & Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and colony collapse disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 134–136. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Faita, M.R., Oliveira, E. de M., Alves, V.V., Orth, A.I., Nodari, R.O., 2018. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere* 211, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.189>
- Faita, M. R., Chaves, A., Guedes Corrêa, C. C., Silveira, V., & Onofre Nodari, R. (2021). Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. *Chemosphere*, 292(December 2021), 133334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133334>
- Faghani, M., & Rahimian, Y. (2018). *Effect of glyphosate on honey bee (Apis Mellifera)*

- performance*. 7(3), 77–81. [www.iaees.org](http://www.iaees.org)
- Fathi, M. A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., & Li, C. (2020). Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(14), 16865–16875. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08269-3>
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Giannini, T. C., Cordeiro, G. D., Freitas, B. M., Saraiva, A. M., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 849–857. <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35–120. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2)
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2), 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Gonalons, C. M., & Farina, W. M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 221(7). <https://doi.org/10.1242/jeb.176644>
- Gong, Y., & Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*, 26(1), 0–1. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>
- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Graffigna, S., Marrero, H. J., & Torretta, J. P. (2020). Glyphosate commercial formulation negatively affects the reproductive success of solitary wild bees in a

- Pampean agroecosystem. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00816-8>
- Gregorc, A., & Ellis, J. . (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol*, 99(2), 200–207.
- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M., Maleszka, R., & Belzunces, L. P. (2001). Contrasting effects of Imidacloprid on habituation in in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(2), 183–191. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3995>
- Hagler, J. R, Mueller, S., Teuber, L. R, Machtley, S. A & Van Deynze, A. (2011). Faixa de forrageamento de abelhas, *Apis mellifera* , em campos de produção de sementes de alfafa. *J. Insect Sei.* 11: 144. doi: 10.1673 / 031.011.14401
- Helmer, S. H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., & Boily, M. (2015). 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*, 22(11), 8010–8021. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>
- Herbert, L. T., Vázquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217(19), 3457–3464. <https://doi.org/10.1242/jeb.109520>
- Hyne, R. V., & Maher, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(3), 366–374. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00119-7)
- IARC - International Agency for Research on Cancer. (2017). *Some organophosphate insecticides and herbicides*. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112.pdf>
- IBAMA - Ministério do meio ambiente. (2020). *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>
- IPBES. (2016). Pollination and. In *Science* (Vol. 325, Número 5940).
- Israili, Z. H. (2014). Antimicrobial properties of honey. *American Journal of Therapeutics*, 21(4), 304–323. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b>
- Johnson, R. (2013). Honey bee colony collapse disorder. *Honey Bees and Colony Collapse Disorder: Select Analyses*, 69–92.

- Jumarie, C., Aras, P., & Boily, M. (2017). Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*, *168*, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
- Kirkwood, R. C., Hetherington, R., Reynolds, T. L., & Marshall, G. (2000). Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): Influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest Management Science*, *56*(4), 359–367. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S)
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A. B., & Lihoreau, M. (2017). *Why bees are so vulnerable to environmental stressors*. *32*(4), 268–278.
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, *4*(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, *10*(3), 705–728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- Ledoux, M. L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L., & Lee, S. O. (2020). Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control*, *109*(April 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106859>
- Lehmann, D. M., & Camp, A. A. (2021). A systematic scoping review of the methodological approaches and effects of pesticide exposure on solitary bees. *Plos One*, *16*(5), e0251197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251197>
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Liao, L. H., Wu, W. Y., & Berenbaum, M. R. (2017). Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15066-5>
- Lima, É. S., & Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação

- em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 293–303.
- Lima, M. A. P., Martins, G. F., Oliveira, E. E., & Guedes, R. N. C. (2016). Agrochemical-induced stress instingles bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J Comp Physiol A*, 202, 1–15.
- Luo, Q. H., Gao, J., Guo, Y., Liu, C., Ma, Y. Z., Zhou, Z. Y., Dai, P. L., Hou, C. S., Wu, Y. Y., & Diao, Q. Y. (2021). Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80445-4>
- Mackos, A. R., Varaljay, V. A., Maltz, R., Gur, T. L., & Bailey, M. T. (2016). Role of the intestinal microbiota in host responses to stressor exposure. In *International Review of Neurobiology* (1<sup>o</sup> ed, Vol. 131). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.002>
- Maini, S., Medrzycki, P., & Porrini, C. (2010). The puzzle of honey bee losses: A brief review. *Bulletin of Insectology*, 63(1), 153–160.
- Marques, E., Corrêa, B., Deus, T. De, Vilas-boas, J. A., Rabelo, G., Carvalho, L., Fernandes, R., Oliveira, R. De, & Jaqueline, S. (2021). *Science of the Total Environment Three-bestseller pesticides in Brazil : Freshwater concentrations and potential environmental risks.* 771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>
- Michener, C. . (2007). *The Bees of the World.* Baltimore.
- Motta, E. V. S., Mak, M., De Jong, T. K., Powell, J. E., O'Donnell, A., Suhr, K. J., Riddington, I. M., & Moran, N. A. (2020). Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2020). Impact of glyphosate on the honey bee but microbiota: Effects of intensity, duration, and timing of exposure. *Systems*, 5(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00268-20>
- Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T. J., Godderis, L., & Ádám, B. (2020). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. In *Environmental Research* (Vol. 181). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>

- Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szawarski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2016). Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, *47*(3), 379–388. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0418-2>
- Nocelli, R. C. F., Soares, S. M. ., & Monquero, P. . (2019). Effects of herbicides on the survival of the brazilian native bee *Melipona scutellaris* latreille, 1811 (hymenoptera: apidae). *Planta Daninha*, *2016*, 1–9. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100>
- Odemer, R., Alkassab, A. T., Bischoff, G., Frommberger, M., Wernecke, A., Wirtz, I. P., Pistorius, J., & Odemer, F. (2020). Chronic high glyphosate exposure delays individual worker bee (*Apis mellifera* L.) development under field conditions. *Insects*, *11*(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects11100664>
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, *120*(3), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Oost, R. Van Der, Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *13*(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Orr, M. C., Hughes, A. C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.-D., & Ascher, J. S. (2020). Global patterns and drivers of bee distribution. *Current Biology*, *31*(0), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>
- Pérez, L., Solange, M., & Mir, L. (2011). Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. *Herbicides and Environment*, *May*. <https://doi.org/10.5772/12877>
- Pignati, W. A., e Lima, F. A. N. de S., de Lara, S. S., Correa, M. L. M., Barbosa, J. R., Leão, L. H. D. C., & Pignatti, M. G. (2017). Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. *Ciencia e Saude Coletiva*, *22*(10), 3281–3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>
- Pires, C. S. S., de Mello Pereira, F., do Rêgo Lopes, M. T., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis, J. S., & Teixeira, É. W. (2016). Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *51*(5), 422–

442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS Journal*, 278(16), 2753–2766. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 8(4), 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>
- Biologia celular e molecular, 3 Rev. Elet. Cient. 694 (2017).
- Rosanigo, M. P., Marrero, H. J., & Torretta, J. P. (2020). Limiting resources on the reproductive success of a cavity-nesting bee species in a grassland agroecosystem. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 583–591. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1726034>
- Sadd, B. M., Barribeau, S. M., Bloch, G., de Graaf, D. C., Dearden, P., Elsik, C. G., Gadau, J., Grimmelikhuijzen, C. J. P., Hasselmann, M., Lozier, J. D., Robertson, H. M., Smagge, G., Stolle, E., Van Vaerenbergh, M., Waterhouse, R. M., Bornberg-Bauer, E., Klasberg, S., Bennett, A. K., Câmara, F., ... Worley, K. C. (2015). The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0623-3>
- Samsel, A., & Seneff, S. (2013). Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy*, 15(12), 1416–1463. <https://doi.org/10.3390/e15041416>
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2016). Impacts of Pesticides on Honey Bees. In *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research* (Número May). <https://doi.org/10.5772/62487>
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232(January), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Seide, V. E., Bernardes, R. C., Pereira, E. J. G., & Lima, M. A. P. (2018). Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*, 243, 1854–1860. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>

- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., Dar, O. I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Silva, G. M., Finley, D., & Vogel, C. (2015). K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(2), 116–123. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2955>
- Souza, A. P. F., Rodrigues, N. R., & Reyes, F. G. R. (2021). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 14(1), 40–47. <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1855676>
- Stein, K., Coulibaly, D., Stenchly, K., Goetze, D., Porembski, S., Lindner, A., Konaté, S., & Linsenmair, E. K. (2017). Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17970-2>
- Tomé, H. V. V., Schmehl, D. R., Wedde, A. E., Godoy, R. S. M., Ravaiano, S. V., Guedes, R. N. C., Martins, G. F., & Ellis, J. D. (2020). Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environmental Pollution*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113420>
- Vázquez, D. E., Balbuena, M. S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., & Farina, W. M. (2020). Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>
- Vázquez, D. E., Iliina, N., Pagano, E. A., Zavala, J. A., & Farina, W. M. (2018). Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS ONE*, 13(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205074>
- Vázquez, D. E., Latorre-Estivalis, J. M., Ons, S., & Farina, W. M. (2020). Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environmental Pollution*, 261, 114148. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114148>
- Wiley, J., & Sons, H. I. (2010). *A textbook of modern toxicology* (E. Hodgson (org.)).
- Wiley, J., & Sons, I. (2004). *The honey bee colony as a superorganism* (Vol. 77, Número 6).

- WorldAtlas. (2021). *Top Pesticide Using Countries*.  
<https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>
- Yu, S. J., Robinson, F. A., & Nation, J. L. (1984). Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(3), 360–368.  
[https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90029-4)
- Zattara, E. E., & Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth*, 4(1), 114–123.  
<https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>
- Zgurzynski, M. I., & Lushington, G. H. (2019). Glyphosate impact on *Apis mellifera* navigation: A combined behavioral and cheminformatics study. *Pharmacology & Toxicology*, 7(8), 806–824.
- Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2011). *Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus*. 1(2), 125–144.
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., Wang, H., Liu, Z., Guo, X., & Xu, B. (2020). Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Science of the Total Environment*, 744, 140819.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140819>
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017a). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421>
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017b). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(5), 1–16.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176837>

## 5 CAPÍTULO 2: IS GLYPHOSATE TOXIC TO BEES? A META-ANALYTICAL REVIEW.

Artigo publicado no periódico STOTEN (Science of The Total Environment)<sup>1</sup>

### Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review

#### Authors

Lucas Battisti<sup>1</sup>, Michele Potrich<sup>2</sup>, Amanda Roberta Sampaio<sup>2</sup>, Nédia de Castilhos Ghisi<sup>3</sup>, Fabiana Martins Costa-Maia<sup>4</sup>, Raiza Abati<sup>2</sup>, Claudia Bueno dos Reis Martinez<sup>1</sup>, Sílvia Helena Sofia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina (UEL), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário 86057-970, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Dois Vizinhos, LABCON, Estrada para Boa Esperança, km 04, Comunidade São Cristóvão, 86660-000, Dois Vizinhos, PR, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, UTFPR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Estrada para Boa Esperança, km 04, Comunidade São Cristóvão, 86660-000, Dois Vizinhos, PR, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Dois Vizinhos, UNEPE Apicultura, Estrada para Boa Esperança, km 04, Comunidade São Cristóvão, 86660-000, Dois Vizinhos, PR, Brasil

M. Potrich

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Dois Vizinhos, Laboratórios de Controle Biológico I e II, Estrada para Boa Esperança, km 04, Comunidade São Cristóvão, 86660-000, Dois Vizinhos, PR, Brazil. Phone: +55 4635368901, Fax +55 (46) 35368905

E-mail: [profmichele@gmail.com](mailto:profmichele@gmail.com)

E-mail2: [michelepotrich@utfpr.edu.br](mailto:michelepotrich@utfpr.edu.br)

#### Highlights

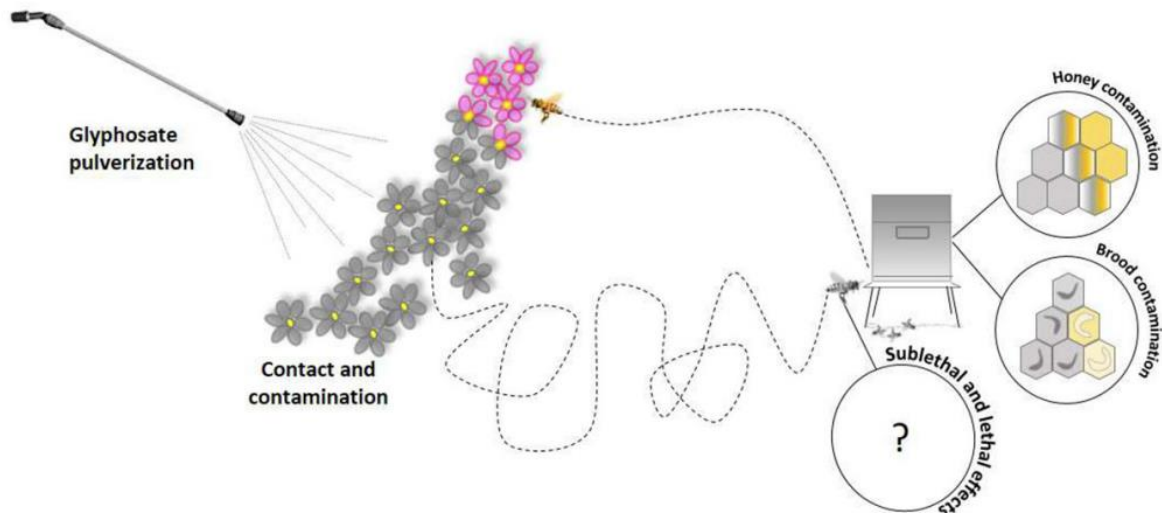
- Meta-analytical review correlating glyphosate (GLY) exposure with bee mortality.
- Significant differences between bees exposed to GLY and control group.
- Ingestion and contact of bees with GLY had a significant effect.

---

<sup>1</sup> Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A. R., de Castilhos Ghisi, N., Costa-Maia, F. M., Abati, R., dos Reis Martinez, C. B., & Sofia, S. H. (2021). Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Science of The Total Environment*, 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721004654?casa\\_token=LYm0XMlJ\\_oAAAAA:BXZM4blw\\_Z8O4JxNjQumVvHFXScoXnE\\_oC\\_1PuX9Lv2gOlpcVFAQkg\\_qIEe5tOoJXFFLEwxeak](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721004654?casa_token=LYm0XMlJ_oAAAAA:BXZM4blw_Z8O4JxNjQumVvHFXScoXnE_oC_1PuX9Lv2gOlpcVFAQkg_qIEe5tOoJXFFLEwxeak)

- Most bee species used as a study model were negatively affected by glyphosate.
- Further studies are suggested about sublethal effects of GLY on bees

### Graphical Abstract



### Abstract

Glyphosate (GLY) is an herbicide widely used in agriculture. First considered as non-toxic or slightly toxic to bees, GLY and its different formulations have shown, more recently, to affect negatively the survival, development and behavior of these insects, even when used in doses and concentrations recommended by the manufacturer. Thus, the results of research on the toxicity of GLY to bees are often conflicting, which makes a meta-analysis interesting for data integration, generating a statistically reliable result. Therefore, this study aimed to evaluate the GLY effects on mortality of bees through a meta-analysis. For this, a search was carried out in the databases Web of Science, CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil), Scopus, and PubMed. Papers that evaluated the effect of GLY on bee mortality published between 1945 and October 2020, were considered. After obtaining the data, R software was used to perform the meta-analytical tests. Sixteen papers on mortality were selected with 34 data sets. Most of the sets demonstrated differences between the control and experimental groups, showing that the treatments with GLY caused higher mortality of bees. The results considering the methodology used (ingestion or contact) the phase of the biological cycle (adults or larvae) and the dose (ecologically relevant dose and recommended by the manufacturer) were different when compared with their respective control groups. Therefore, GLY can be considered toxic to bees.

It is important to emphasize that this meta-analysis identified that papers assessing the toxicity of GLY to bees are still scarce, for both lethal and sublethal effects, mainly for stingless and solitary bee species.

Keywords: mortality, toxicity, pollinators, pesticides and herbicide

## 5.1 INTRODUCTION

Glyphosate (GLY) is the best-selling pesticide in the world, accounting for 71.6% of the active ingredients marketed (Benbrook, 2016). Its use stands out in Brazil, where it represents approximately 31.45% of the chemical products sold per year (IBAMA, 2020). GLY is an herbicide from the chemical group [N-(phosphonomethyl) glycine], with the molecular formula  $C_3H_8NO_5P$  (Molecular weight= 169.1 g.mol<sup>-1</sup>), used in the control of several weed species (Dill et al., 2010; Richmond, 2018).

This active principle acts by inhibiting the growth of plants and some microorganisms, as it interferes with the functioning of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). This enzyme acts on the metabolic pathway of “shikimic acid”, important in the formation of the amino acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, used in protein synthesis (Amarante Junior et al., 2002; Ledoux et al., 2020).

Glyphosate is commonly formulated in its form of isopropylamine salt (IPA salt), though several other related chemical forms are also commercialized. In the 1970s, glyphosate was introduced in the market as Roundup™ (= Roundup Ready™), which also includes the surfactant polyoxyethyleneamine (POEA) in the commercial product formulation (Pérez et al., 2011). Following the introduction of Roundup™, the use of glyphosate and several other glyphosate-based products increased significantly (Benbrook, 2016; Pérez et al., 2011; Richmond, 2018). Nowadays, agricultural activities are highly dependent on the use of glyphosate-based herbicides, and the global consumption of these products has increased hundreds-fold since the development of genetically modified plants in the mid-1990s (Richmond, 2018). Despite the benefits of using pesticides in agricultural activities (Lewis et al., 2016), including GLY, if not properly used they can cause negative impacts on ecosystems through contamination of water, air, food, fauna, and flora (Giesy et al., 2000; IARC, 2015; WHO, 2017).

While several studies have acknowledged GLY and glyphosate-based herbicide as products practically non-toxic or slightly toxic to animals (Blake and Pallett, 2018; Dill et al., 2010; Giesy et al., 2000; Rolando et al., 2017), other researches have shown negative effects on non-target organisms (Pérez et al., 2011; Gill et al., 2018; Richmond, 2018), including *Apis mellifera* (Balbuena et al., 2015; Gill et al., 2018; Motta et al., 2020; Richmond, 2018) and several other bee species. Regarding bees, they are indubitably among the most exposed organisms to glyphosate-based products, since these insects depend on resources produced by angiosperms such as pollen and nectar (Michener, 2007).

In this context, GLY can decrease food resources, reducing the diversity of plants around the crop and, consequently, reducing pollen and nectar. It can also cause the contamination of forage bees when they go in search of resources to maintain the hive (Johnson, 2015). Lethal and sublethal effects of GLY have been observed to larvae and adults of several bee species (Blot et al., 2019; Motta et al., 2018; Nocelli et al., 2019; Pires et al., 2016; Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2018). Moreover, it is also shown that GLY impairs the cognitive capacities needed to navigate successfully back to the hive (Balbuena et al., 2015), as well as the sleep in honey bees (Vázquez et al., 2020a), indicating a negative effect of this herbicide on bee behavior. Thus, it is not surprising that GLY is now recognized as moderately toxic to bees (PPDB, 2020).

In the environment, the GLY molecule is degraded and transformed into other compounds by microbial action (Mamy et al., 2016; Gill et al., 2018). The main product of GLY degradation is aminomethylphosphonic acid (AMPA), which can contaminate water, soil, food and living organisms (Blot et al., 2019; Gill et al., 2018; Van Bruggen et al., 2018; Zhang et al., 2015). Recently, metabolites resultant from GLY degradation have also been focus of interest concerning their impacts on bees. Specifically, data on the effect of AMPA exposure to bees have become available (Blot et al., 2019; El Agrebi et al., 2020), revealing that AMPA is neither lethal to *A. mellifera* (El Agrebi et al., 2020) and nor alters its intestinal microbiota (Blot et al., 2019). However, the number of studies is still scarce to draw any definitive conclusion on the effects of these residues on bees.

With more than 20,000 species described (Orr et al., 2020), bees are important pollinators of both natural vegetation and crops, participating in the cross-fertilization of most angiosperms (Michener, 2007). They are involved in the reproduction of

approximately 73% of the vegetables grown in the world, increasing the yield of crops and the genetic variability of plants (Beringer, 2019; Calderone, 2012; FAO, 2013). In addition, their products are useful for humans, such as honey and propolis (FAO, 2013; Pires et al., 2016). However, GLY residues in samples of honey have been detected in concentrations above the limit of quantification – LOQ (Rubio et al., 2014). In this context, some species of bees are being used as bioindicators of environmental contaminants (Balayiannis and Balayiannis, 2008; Quigley et al., 2019). Bees have also been used as an animal model for human cell testing (Maleszka, 2014).

Considering the importance of bees, researchers have been working to explain the possible causes of the decline in bee populations and colony collapse disorder (CCD). In this perspective, studies that evaluate the effect of glyphosate-based products on bees are becoming increasingly important for understanding the possible impacts on different species (Cullen et al., 2019; Goulson, 2003; Pires et al., 2016).

However, many papers report conflicting, or even contradictory results regarding the effect of GLY on bees. In this sense, the development of a meta-analysis is useful to compile results from different studies, since it uses mathematical criteria, synthesizing the data and enabling the formation of a statistically reliable conclusion on the subject (Fagard et al., 1996; Hua and Bureau, 2012). In addition, as far as we know, there are no meta-analyses on the impact of GLY on bees. Therefore, the objective of this study was to evaluate the lethal (mortality) effects of the herbicide GLY on several species of bees through a meta-analysis.

## 5.2 MATERIALS AND METHODS

### 5.2.1 Study development, data search and structuring

This is a meta-analytical review conducted in accordance with the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA, 2015). A search was conducted in the electronic databases “Web of Science” (<http://www.webofscience.com>), Periódicos CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil) (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>), and PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). For the development of the meta-

analysis, papers with data on the effects of GLY on bee mortality / survival were searched.

For this, the Boolean operators were used with the following keywords: "Glyphosate" AND "bees" AND ("mortality" OR "selectivity" OR "longevity" OR "toxicity" OR "survival"), surveyed in English, Portuguese, and Spanish. In addition, references from relevant publications, such as review papers, were checked to identify additional papers with data corresponding to the objectives of the present study. In addition, a second Boolean script was used with the keywords: "Glyphosate" and "bees", to refine the search and identify papers with data on bee mortality exposed to GLY. The inclusion criteria were: (1) Papers that evaluated the toxicological effect of the herbicide glyphosate; (2) Papers that used bees as a model organism; and (3) Papers that presented the total number of bees used in the experiment, in addition to the number of dead bees (control and experimental groups).

For the development of the meta-analysis, data from papers published between 1945 and October 2020 were searched, considering those including mortality / survival data, with no limitation on the species of bee or the age, country, author, or language of the work. In some cases, the authors of the papers were consulted for additional information or clarification. Papers that evaluated products with other active ingredients or sublethal effects, and those without numerical values of mortality in the results were disregarded, and no reviews, notes, book chapters, or book reviews were included. The exclusion criteria were: (1) Insufficient data for the meta-analysis; (2) Not presenting data on bee mortality or survival; and (3) Papers with mortality data but without details of the number of dead bees in the experimental and control groups.

An analysis was carried out in the papers initially selected to verify the methodological quality, with the aid of the Strengthening the Reporting checklist of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) (Cuschieri, 2019). In that Twenty-two items are referred to in the instrument reported, improving methodological rigor.

A table was constructed containing the following information: DOI, authors, year of publication, methodology evaluated, species and life stage of the bee, time of experiments (converted to days), GLY dose/concentration, total number of bees, and number of live and dead bees (control and experimental groups). In each paper, data from the control group and the experimental group were used, as in a meta-analysis each paper was weighted considering the sample size (n), mean, and standard deviation.

Among the papers selected for data extraction, many tested ecologically relevant doses, which can be found in the environment, for example, in pollen, wax, nectar, cultures, among others. Doses such as 0.0086 µg / bee and 0.00013 µg / bee (Tomé et al., 2020), 275 ng / a.e and 550 ng / a.e (Blot et al., 2019) and 0.16 mL / bee (week) (Zhu et al., 2017a). However, other articles have evaluated the doses recommended by the manufacturers, doses such as 0.5 ng / bee (day) (Jumarie et al., 2017), 140 µL / bee (Dai et al., 2018), 1.5 µL / 200mL (Faita et al., 2020). These data and others are described in Table 1. In the literature, it is not common to find several articles that tested the same concentration or dose of GLY. The usual thing is to find research that tested different doses / concentrations in order to expand the results and information about the effect of GLY on animals (Leoci and Ruberti, 2020), including bees.

Subsequently, the data were separated into categories according to the methodology (feeding, contact, and spraying), stage of life (adult or larva), and species. The reason for having multiple entries for single papers for the same age and concentration is 1:1, that is, a control for an experimental group. Studies that presented their results in graphic format or as a percentage were transformed into real numbers (WebPlotDigitizer, 2020), according to the sample number described in the methodology.

### 5.2.2 Data Analysis

After obtaining the data, R software (version 3.6.3) was used to perform the meta-analytical tests (R Core Team, 2020), which were analyzed using the 'metafor' package (Viechtbauer, 2017, 2010). The estimate of the effect of each variable was calculated using the odds ratio (Borenstein et al., 2009).

The computational formula for the probability ratio is:  $OddsRatio = \frac{AD}{BC}$ , where  $A$  is the number of exposed dead bees (cases);  $B$  the number of exposed alive bees (non-cases);  $C$  the number of unexposed dead bees (cases); and  $D$  the number of unexposed alive bees (non-cases). The log odds ratio is:  $LogOddsRatio = \ln(OddsRatio)$ . The approximate variation is:  $V_{LogOddsRatio} = \frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}$ , and the

approximate standard error is  $SE_{LogOddsRatio} = \sqrt{V_{LogOddsRatio}}$ . From this, a variation for the odds ratio was calculated. The log odds ratio and its variation are used in the analysis to produce a summary effect, confidence limits, and so on, in log units. We then converted each of these values into odds ratios using  $OddsRatio = \exp(LogOddsRatio)$ ,  $LL_{OddsRatio} = \exp(LL_{LogOddsRatio})$  and  $UL_{OddsRatio} = \exp(UL_{LogOddsRatio})$ , where LL and UL represent the lower and upper limits, respectively (Borenstein et al., 2009; McHugh, 2009; Szumilas, 2010).

All methods that estimate the effects size (E+) vary from  $-\infty$  to  $+\infty$ , where zero is the absence of difference between the control and the experimental groups. Negative values indicate that the control group had a higher value than the experimental group and positive values indicate that the experimental group had a higher value than the control group (Hedges, 1981). Values that the confidence interval (CI) do not cross zero are significant.

The heterogeneity between the studies was estimated by the Cochran Q test and  $I^2$  statistics (Higgins et al., 2006). The  $I^2$  statistic describes the percentage of total variation in the point estimates that can be attributed to heterogeneity. For metric  $I^2$ , low, moderate, and high values were considered 25%, 50%, and 75%, respectively (Higgins, 2008). An  $I^2 \geq 75\%$  was considered to be highly heterogeneous and not attributable to chance (Van Maele-Fabry et al., 2011).

Publication bias was analyzed using the Kendall method, which is more suitable when considering a smaller number of data sets (Rosenberg et al., 2000). The safe number of failures was determined by the Orwin method, which allows determination of how many missing studies would take the general effect to a specified level other than zero (Borenstein et al., 2009; Orwin and Boruch, 1982). A funnel plot was generated to explore the data; however, it is essential to interpret the numerical data generated by the above methods.

## 5.3 RESULTS

### 5.3.1 Selection of items and data sets

After the initial search carried out in the databases, the abstracts were read, and several papers excluded. Subsequently, each paper was evaluated to verify whether it presented the necessary data for the meta-analysis. Finally, papers with numerical data on the mortality of bees exposed to GLY and a control were included. After refinement, 52 papers were found, of which 16 papers were selected because they met all the inclusion criteria, generating 34 data sets (Fig. 1, Table 1).

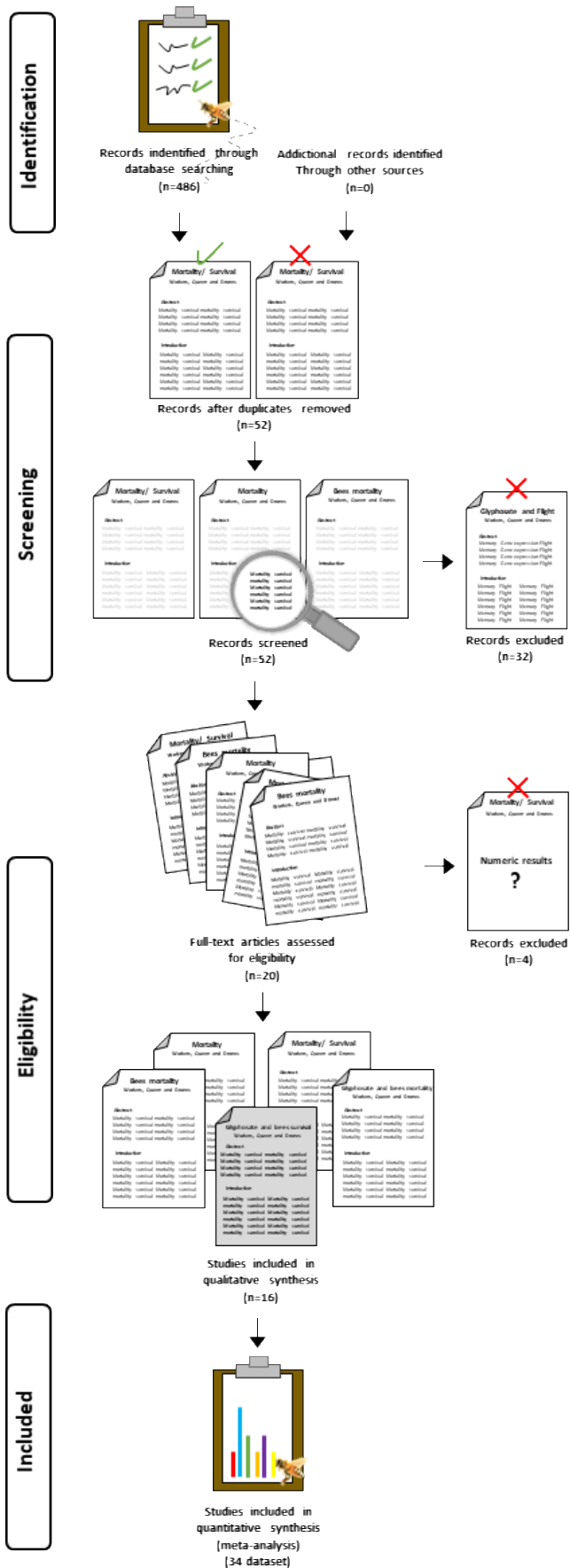


Figure 1: Figure 1. Papers identified and selected from the search carried out in the

databases “Web of Science”, Periódicos Capes, Scopus, and PubMed, considering criteria of mortality of the bees.

Source: Authors. Adapted of PRISMA (2015).

**Table 1:** Data on bee mortality: identification number of each paper in the meta-analysis, reference citation, methodology used, bee species, stage of the life cycle and concentration/dose used.

ID	Citation	Methodology	Bees species	Life cycle	CONC <sup>a</sup>	Dose reported by the authors
<b>Ecologically Relevant Dose</b>						
1	(Tomé et al., 2020)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	54 µg/L	0.0086 µg/bee
2	(Tomé et al., 2020)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	0.8 µg/L	0.00013 µg/bee
3	(Blot et al., 2019)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	0.21 g/kg	-
4	(Blot et al., 2019)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	0.21 g/kg	-
5	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	5 mg/L <sup>-1</sup>	275 ng/a.e <sup>b</sup>
6	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	2.5 mg/L <sup>-1</sup>	550 ng/a.e <sup>b</sup>
7	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	5 mg/L <sup>-1</sup>	275 ng/a.e <sup>b</sup>
8	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	2.5 mg/L <sup>-1</sup>	550 ng/a.e <sup>b</sup>
9	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	5mg/L <sup>-1</sup>	275 ng/a.e <sup>b</sup>
10	(Vázquez et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	2.5 mg/L <sup>-1</sup>	550 ng/a.e <sup>b</sup>
11	(Zhu et al., 2017a)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	35 mg/L	0.16 mL/ bee (week)
12	(Zhu et al., 2017b)	Spraying	<i>Apis mellifera</i>	Adults	2500 mg/L	0.5 mL solution/bees group
<b>Manufacturer Recommended Dose</b>						
13	(Jumarie et al., 2017)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	0.12 mg/L	0.5 ng/bee (day)
14	(Thompson et al., 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae		
15	(Thompson et al., 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	2.16 kg	60.8 mg nectar/day and 5.2
16	(Thompson et al., 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	a.e. <sup>b</sup> /ha	mg pollen/day
17	(Thompson et al., 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae		
18	(Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	178g/L	-
19	(Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014)	Feeding	<i>Tetragonisca angustula</i>	Adults	400 µg/L	-
20	(Almasri et al., 2020)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	10 µg/L	677,7 mg/bee
21	(Motta et al., 2020)	Spraying	<i>Apis mellifera</i>	Adults	540 g/L	1.2 mL water (0.1 % GLY)/bees group
22	(Seide et al., 2018)	Feeding	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Larvae	480 g/L	140 µL/bee

23	(Abraham et al., 2018)	Contact	<i>Apis mellifera</i>	Adults	360 g/L (10	
24	(Abraham et al., 2018)	Contact	<i>Hypotrigona ruspollii</i>	Adults	mL/L <sup>-1</sup> of -	
25	(Dai et al., 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Larvae	4mg/L	140 µL/bee
26	(Gonalons and Farina, 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	2.5 mg/L	66.2 µL/bee (5 days)
27	(Gonalons and Farina, 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	2.5 mg/L	132.4 µL/bee (9 days)
28	(Gonalons and Farina, 2018)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	2.5 mg/L	246,8 µL/bee (14 days)
29	(Helmer et al., 2015)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	5 ng/bee	24.9 µL/bee
30	(Herbert et al., 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	2.5 mg/L	0.33 mL/bee (14 days)
31	(Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	178g/L	-
32	(Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014)	Feeding	<i>Tetragonisca angustula</i>	Adults	400 µg/L	-
33	(Faita et al., 2020)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	480 g/L	1.5 µL/200mL
34	(Faita et al., 2020)	Feeding	<i>Apis mellifera</i>	Adults	480 g/L	1.5 µL/200mL

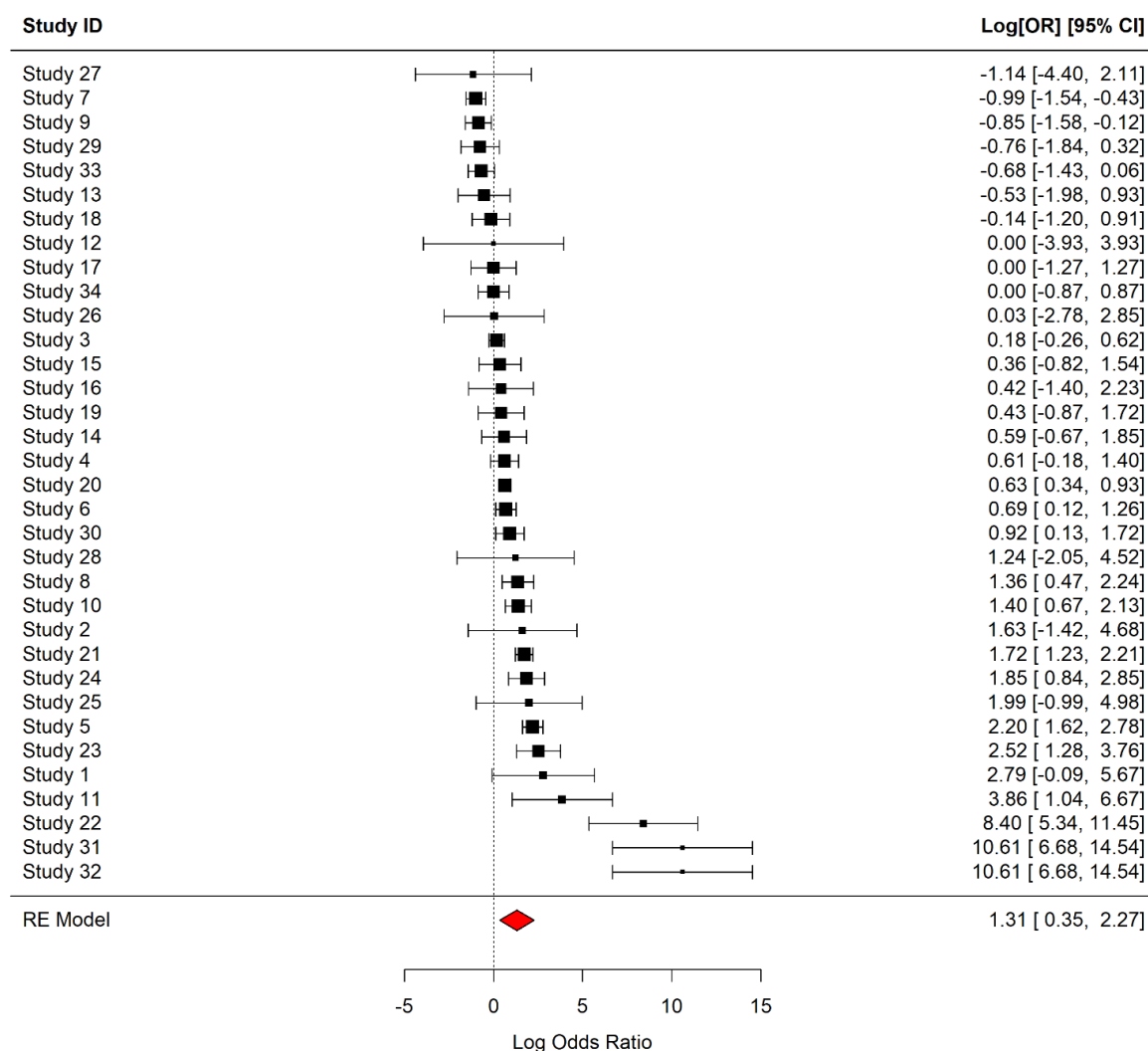
<sup>a</sup>Concentration

<sup>b</sup>Acid equivalent

Some papers found in the database searches, which evaluated the effect of GLY on bee mortality/survival, could not be included in this meta-analysis, because they did not present the number of dead bees. However, they still represent extremely important research for understanding the negative effects of this active ingredient on bees (Abou-Shaara and Abuzeid, 2018; Faghani and Rahimian, 2018; Nocelli et al., 2019; Vázquez et al., 2020b). As the values of  $I^2$  and the Cochran Q test were greater than 25%, the data were heterogeneous, therefore, the random effect model was more suitable for data analysis ( $P < 0.0001$ ,  $QDF = 33$ , and  $I^2 = 97.42\%$ ).

### 5.3.3 Analysis of the lethal effects of glyphosate on bees

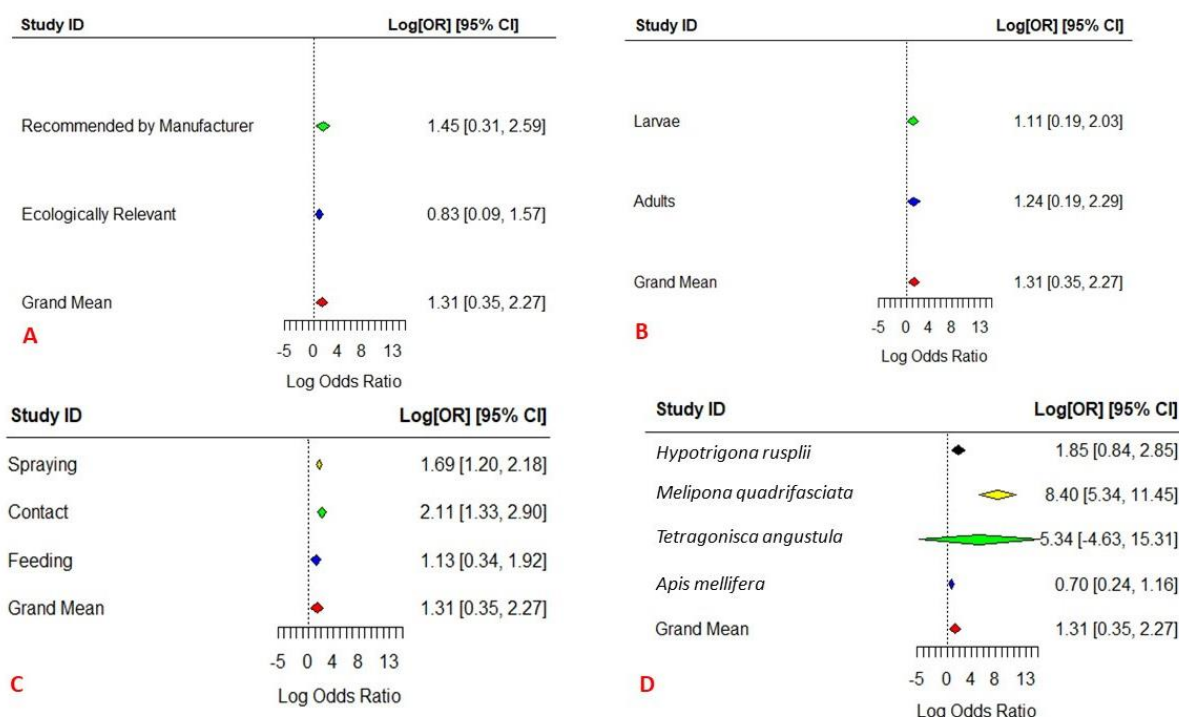
With the use of the random effects model, it can be observed that there was a difference between the treatments with GLY and the control ( $E+1.31$ ,  $CI: 0.35 - 2.27$ ,  $P=0.0077$ ). As the CI did not cross zero, it was possible to observe a clear and significant increase in the mortality of bees exposed to GLY ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2; Table S1).



**Figure 2:** Papers that evaluated the effect of GLY on bee mortality / survival, organized by effect size. The numbers on the right side represent the mean mortality and the confidence interval (CI - 95%) for each experiment. The numbers on the left side represent each paper as shown in Table 1. The vertical lines represent each set of papers and the general polygon is the Grand mean summarizing the effects size of all studies.

#### 5.3.4 Categorization of Results

The data were categorized according to the dose used (ecologically relevant and recommended by the manufacturer), exposure methodology used (feeding, spraying, and contact), life stage of the bee (larvae or adults), and species of bee (Table S1). Considering the dose used, the one recommended by the manufacturer and the ecologically relevant dose had a difference in relation to the control group, with E+ 1.45 and E+ 0.83, respectively. In this context, bees submitted to feeding and contact with GLY were more affected than bees in the control group (Fig. 3A).



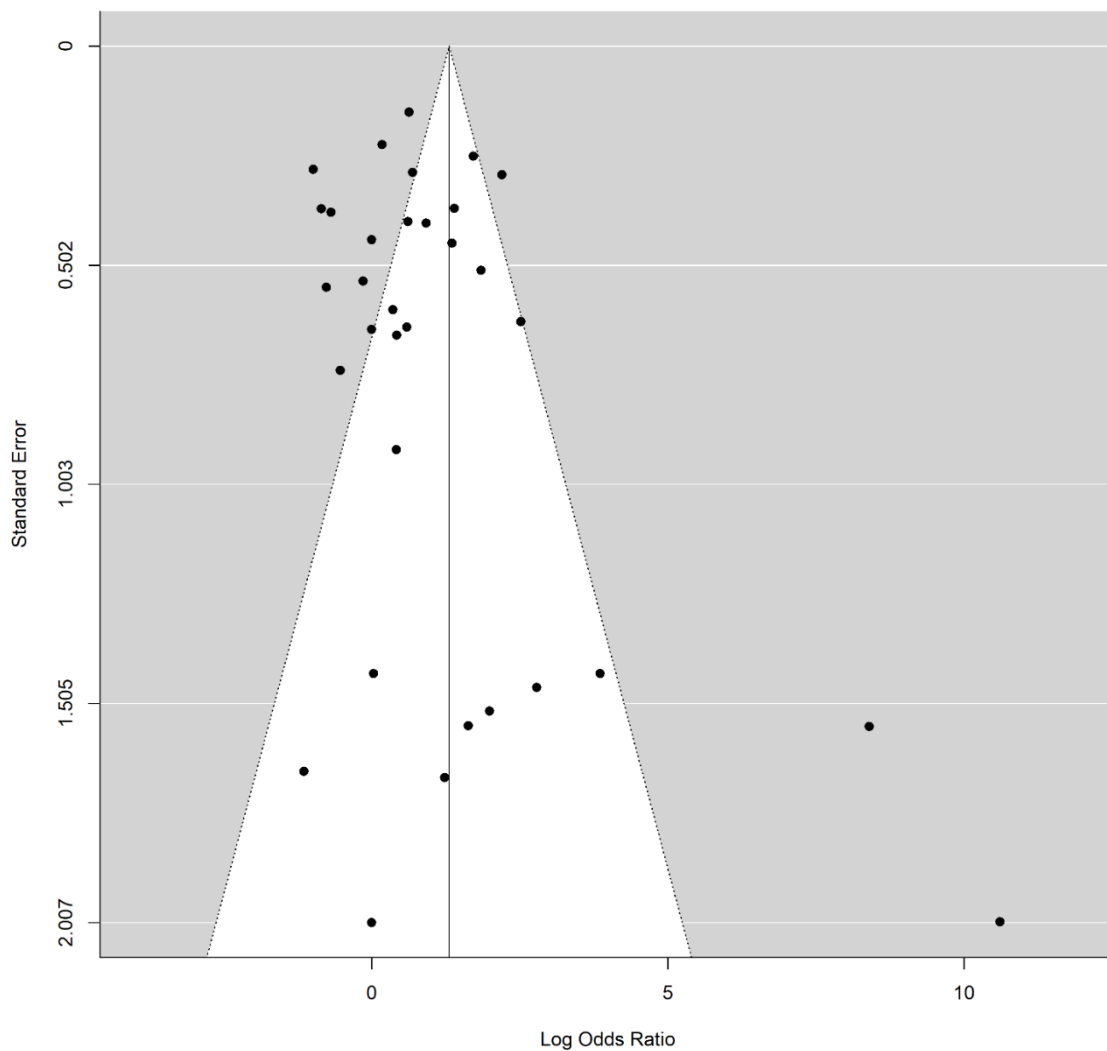
**Figure 3:** Forest plot with the categorization of results by dose (A), methodology (B), life stage (C), and species of bees (D). The mean mortality (effect size and  $\ln R$ ) and the confidence interval (CI - 95%) are shown on the right side of each graph. The grand mean is the overall effect size of all studies. “Study ID” represents the different categories analyzed.

When analyzing mortality rates at different stages of life, it was observed that in the adult and larval stages, there was a difference between the experimental and control groups. For adult bees the average mortality was 1.24 (CI: 0.19 - 2.29) and for larval phase was 1.11 (CI: 0.19 - 2.03) (Fig. 3B).

Regarding the exposure methodology, feeding, contact and spraying showed differences in relation to the control group, with E+ 1.13, E+ 2.11 and E+1.69, respectively. In this context, bees submitted to feeding and contact with GLY were more affected than bees in the control group (Fig. 3C). Evaluating the different species of bees, it was found that the treatments with GLY caused significant mortality in *Melipona quadrifasciata* Lepelletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae), *Hypotrigena ruspilii* Magretti, 1961 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) (means of 8.40, 1.85, and 0.77, respectively) compared to the respective control groups (E+ 1.46, CI: 0.38 - 2.53) (Fig. 3D).

### 5.3.5 Publication Bias

The Kendall correlation coefficient, a statistical method for testing bias, showed no significant correlation ( $P = 0.1639$ ), indicating that there was no publication bias, therefore, the data are not biased (Fig. 4). In addition, according to the Orwin method, the failsafe number was 30, so the effect of missing studies on this meta-analysis is zero (Borenstein et al., 2009).



**Figure 4:** Figure 4. Funnel plot for the association of bee mortality with GLY exposure. The X-axis represents the Log Odds Ratio and the Y – Axis represents the standard error.

## 5.4 DISCUSSION

In recent decades, several papers have evaluated the lethal and sublethal effects of GLY on non-target organisms, using several animals as models of toxicological evaluation (Desneux et al., 2007; Ghisi et al., 2016; Giesy et al., 2000; Gill et al., 2018). Although many papers have used bees for toxicological evaluation (Abraham et al., 2018; Blot et al., 2019; Dai et al., 2018; Helmer et al., 2015; Motta et al., 2018; Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014; Tomé et al., 2020), this is the first meta-analysis to compile data on GLY and the relationship with bee mortality.

In Europe and the USA, most research studies on the toxicity of herbicides to bees, evaluate the mortality rate through comparisons with sublethal effects, and laboratory papers are more frequent than field studies (Cullen et al., 2019). However, publications on the toxicological effects of GLY on bees are still scarce. Among the published papers, many present conflicting results on the real impact of this product, making the development of a meta-analysis a useful tool for data integration, increasing the reliability of scientific results (Fagard et al., 1996; Filho et al., 2014; Lovatto et al., 2007).

Most of the data sets showed a difference between the control group and the experimental group, and the treatments with GLY caused a higher mortality rate of bees. These results are worrying, as this active ingredient is one of the most widely used pesticides in the world (Benbrook, 2016), and bee contact with these products, in natural and agricultural ecosystems, can negatively impact the functioning of hives and ecosystem services, such as pollination (Beringer, 2019; Goulson et al., 2015).

Both the ecologically relevant doses and the recommended doses by the manufacturer caused mortality in experimental groups in relation to the control groups. One of the main principles of toxicology is that "dose makes the poison". The potency of a pesticide for bees is determined by the dose of a lethal chemical product to 50% of the individuals ( $LD_{50}$ ), which varies from species to species (Sanchez-Bayo and Goka, 2016). For *A. mellifera* the oral acute  $LD_{50}$  is  $100 \mu\text{g}\cdot\text{bee}^{-1}$  and contact acute  $LD_{50} > 100 \mu\text{g}\cdot\text{bee}^{-1}$  (PPDB, 2020). Bees can be exposed to high concentrations of GLY when foraging during spraying (up to  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or come into contact with pollen (up

to 629 mg.kg<sup>-1</sup>) and nectar (31.3 mg.kg<sup>-1</sup>) from plants freshly sprayed (Abraham et al., 2018; Motta et al., 2020; Thompson et al., 2014; Zhu et al., 2017b).

In the feeding (ingestion) exposure, it was observed that GLY caused higher mortality when compared to the control group. Ingestion of GLY can impair the survival of *A. mellifera*, causing immature animals to die, resulting in a population reduction (Dai et al., 2018). When exposed to half the commercial concentration of GLY, adults of *A. mellifera* and the stingless bee *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) started to present mortality within 44 minutes, and after 12 hours, there was 100% mortality (Ruiz-Toledo and Sánchez-Guillén, 2014). *Melipona quadrifasciata* adults, exposed orally to GLY at the field dose and at twice the field dose, had a higher mortality rate compared to the control groups (Nocelli et al., 2019).

Conversely, another paper showed that adult workers of *A. mellifera* exposed orally, for 15 days, to two concentrations of GLY, 2.5 mg.L<sup>-1</sup> and 5 mg.L<sup>-1</sup>, had a higher mortality rate, but not significantly different from the control group (24.1%, 20.1% and 10.3% mortality, respectively) (Herbert et al., 2014). *A. mellifera* larvae, fed with 1.25 mg.L<sup>-1</sup> and 5 mg.L<sup>-1</sup> GLY presented delayed ecdysis, and reduction in weight and survival, compared with the control treatment (Vázquez et al., 2018).

In addition, GLY can reduce the biodiversity of microorganisms that make up the bee microbiota. In the digestive tract of these animals, there are eight main bacterial taxa, namely: *Lactobacillus* spp. firm-4; *Lactobacillus* spp. firm-5 (phylum Firmicutes); *Bifidobacterium* spp. (phylum Actinobacteria); *Snodgrassella alvi*; *Gilliamella apicola*; *Frischella perrara*; *Bartonella apis*; *Parasaccharibacter apium*. These microorganisms are important for the physiological homeostasis of bees, as they favor weight gain and strengthen the immune system against pathogens (Kwong and Moran, 2016; Motta et al., 2020).

The ingestion of GLY can induce several physiological problems in bees, making them more susceptible to some pathogens or causing malnutrition (Ledoux et al., 2020). *Apis mellifera* adults treated with glyphosate-containing syrup, presented a significant reduction in the biodiversity of bacteria from the digestive tract from the third day of contact. As a result, there was an increase in mortality when exposed to the opportunistic pathogen *Serratia marcescens* (Motta et al., 2018). However, this same active ingredient did not alter the susceptibility to the pathogen *Nosema ceranae*, but

reduced the abundance of the main bacterial groups in the intestinal microbiota of *A. mellifera*, mainly *Snodgrassella alvi* (Blot et al., 2019).

Adult workers of *A. mellifera* fed with solution containing GLY experienced indirect flights and took more time to reach the hive. The hypothesis is that GLY impairs the cognitive ability of the bees, thus hindering their return (Balbuena et al., 2015), in addition to reducing taste perception and olfactory learning (Gonalons and Farina, 2018). Furthermore, GLY can decrease antenna activity and the frequency with which the bees sleep (*A. mellifera*), which are important for memory formation (Vázquez et al., 2020a). These factors have a negative impact on the health of the bees, impairing the functioning of the colonies. Therefore, GLY may be closely related to the population decline of bees and the phenomenon of colony collapse disorder (Beringer, 2019; Faghani and Rahimian, 2018; Goulson et al., 2015).

Bees exposed to GLY through contact with body surface also showed higher mortality when compared to bees in the control group, for the species *A. mellifera* and *H. ruspollii*. In this methodology, the bees came into contact with plants sprayed at doses recommended by the manufacturer, which, when tested at high doses, caused mortality of 74% and 77%, respectively (Abraham et al., 2018). In the same perspective, it is observed that bees sprayed with GLY also have significant mortality (Motta et al., 2020). However, it is noteworthy that few papers have used these methodologies to assess the effect of GLY on bees.

We must consider that the contact (direct or indirect) of pesticides with the body surface of the bees is a stressor that activates the self-cleaning mechanism, an efficient hygiene habit of these insects (Zhukovskaya et al., 2013). Thus, after topical contact with GLY, bees can clean themselves and, consequently, be contaminated orally with the active ingredient, for the species *A. mellifera* and *Hypotrigena ruspollii* (Abraham et al., 2018), which is a problem because, as mentioned earlier, ingesting GLY can cause bee mortality and other sublethal effects.

Thus, direct contact with GLY, or with a freshly sprayed plant, can harm beneficial insects, such as bees. Therefore, it is important to restrict the access and use of these products only to trained people, as spraying when the bees fly can be harmful (Abraham et al., 2018).

Furthermore, if the forager bees come into contact with GLY at the time of spraying, or even transport contaminated nectar and pollen, they compromise other individuals in the colony (Gill et al., 2018; Helmer et al., 2015). This exposure can

unbalance the entire social dynamics of bees, since the workers are responsible for maintaining the colony, such as the defense. As this active ingredient impairs the cognitive function of these insects (Balbuena et al., 2015), these assignments will be compromised, which can leave the colony vulnerable to several biotic and abiotic factors.

With respect to the life stage of the bees, through the meta-analysis it was observed that GLY causes higher mortality in larvae and adults when compared to the respective control groups. For adult bees, the average mortality was higher, which is worrying, considering that in this phase of the biological cycle, bees leave the hive in search of resources, and can be more easily contaminated (Johnson, 2015; Zhu et al., 2015), resulting in lethal and sublethal effects. This is a problem, considering that adult bees perform various functions in the colony, such as cleaning and operculating cells, producing salivary secretions for feeding the larvae, building the hive, storing food, and protection, among others (Gallo et al., 2002; Zhu et al., 2015).

In this context, it should be considered that in ecosystems (natural and agricultural) adult bees are more exposed to GLY, due to their habit of foraging, a situation which makes them more vulnerable compared to the larvae, increasing the chances of mortality in this phase of the life cycle. In addition, when forage bees come into contact with GLY, they may not return to the hive or take longer to arrive, as cognitive and olfactory aspects are affected, and when they do arrive at the site, they may be excluded by other worker bees because they are contaminated with the product.

Furthermore, foragers can take GLY to the larvae inside the hive, which can impair development, affect survival, and impair the health of bees in the larval stage (Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2018). For example, for *M. quadrifasciata* larvae, GLY is highly toxic, causing 100% mortality during larval development in just a few days of exposure (Seide et al., 2018), in addition to exhibiting a survival risk from other stingless bee species (Botina et al., 2020).

For *A. mellifera* larvae, GLY can delay the process of ecdysis, reduce body weight, and impact survival, as previously mentioned (Vázquez et al., 2018). In addition, the ingestion of GLY can alter the transcription of several *A. mellifera* genes, increasing catabolism and oxidative metabolism in asymptomatic larvae chronically exposed to this active ingredient (Vázquez et al., 2020b).

The contact of bees in the larval phase with GLY can negatively impact the biological cycle in general. For example, when they leave the pupa, young bees have great behavioral and physiological plasticity, which will play important roles in maintaining the hive (Gonalons and Farina, 2018). Therefore, if the larvae are fed with GLY, the effects can be lethal or sublethal, and the bees may develop behavioral and physiological problems in adulthood, which negatively impacts the performance of these animals.

It is important to emphasize that the toxicological effects of GLY on molecular and biochemical parameters are also extremely important for understanding the negative effects of this active principle on the health of bees, reflecting on mortality/survival and colony balance. In recent years, articles have evaluated the effect of glyphosate on gene expression (Gregorc et al., 2012; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020b), enzymatic alterations (Boily et al., 2017; Zhu et al., 2017a, 2017b), and the occurrence of oxidative damage in bees (Boily et al., 2017; Helmer et al., 2015). However, there are few publications on this subject and the effects of GLY on the physiology of these animals are not yet fully understood.

Larvae and newly emerged adults of *A. mellifera* fed with GLY, demonstrated a reduction in the expression of several genes related to detoxification (Gregorc et al., 2012; Tomé et al., 2020; Vázquez et al., 2020b). In addition, the stress caused by GLY negatively impacts the expression of various genes in *A. cerana cerana* Fabricius, 1793 and *A. mellifera ligustica* Spinola, 1806, causing problems in the immune systems, digestive system, nervous system, metabolism of amino acids and carbohydrates (Zhao et al., 2020). Thus, it is possible that the impairment in the expression of these genes, at any time in the biological cycle, is related to other disorders, such as low survival (Tomé et al., 2020). However, as emphasized by the authors, there is a need for further studies for real understanding of the issue.

With respect to the effect of GLY on the change in the enzymatic action of bees, enzymes related to cell detoxification (glutathione s-transferase and esterases) (Lee, 1991; Li et al., 2007), insect immunity (phenoloxidase) (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012), the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose (invertases)(Doner, 1977), and nerve conduction (acetylcholinesterase) (Casida and Durkin, 2013) have been developed. When adults of *A. mellifera* were sprayed with glyphosate, there was a change in the functioning of the enzymes invertase and esterase (Zhu et al., 2017a,b). However, when this active ingredient was supplied

orally, there was a reduction in the activity of phenoloxidase and acetylcholinesterase (Boily et al., 2013; Zhu et al., 2017a). For the enzymatic complex glutathione S-transferase, oral exposure and spraying did not cause changes (Zhu et al., 2017a,b).

The occurrence of oxidative damage, such as lipid peroxidation (LPO), has also been investigated. Glyphosate given orally to adults of *A. mellifera* (at doses of 1.25, 2.5, and 5 ng / bee) did not promote an increase in LPO compared to the control (Helmer et al., 2015). However, Jumarie et al. (2017) observed an increase in LPO after using a dose of 5 ng/bee. Low values of LPO can cause bees to consume a greater amount of food, and doses below 1% of LD<sub>50</sub>, found in pollen, can induce oxidative stress in bees (Helmer et al., 2015; Jumarie et al., 2017). In addition, these factors may be related to bee mortality, since the ingestion of glyphosate is harmful to the health of these animals, as previously mentioned.

Until recently, the risk of GLY persistence in the environment was considered low (Blake and Pallett 2018), since GLY is strongly adsorbed to the soil and its half-life can vary from days to a few months (Giesy et al., 2000; Gill et al., 2015). However, an accumulating body of evidence suggests that glyphosate and its residues can persist in environment, bringing to light concerns on the overall impact of this herbicide on ecosystems and potential toxicity to animals from long-term low-level exposures (Richmond, 2018). In our study, the meta-analysis revealed that 12 out of 14 studies showing increased mortality of bees exposed to GLY and its formulations were performed in bees chronically exposed to the herbicide. Since the repeated applications of glyphosate-based formulations is very a common practice, increasing the persistence or its metabolites in the environment (Andréa et al., 2003), chronic exposure of bees to these products is a plausible condition.

From the results of this study, the need for further research to assess the toxicity of GLY on bees (lethal and sublethal effects) is clear, considering stingless and solitary bees, given the ecological and agronomic importance of these animals. In addition, the effect of GLY on molecular and biochemical parameters is still poorly understood, making further research necessary to assess the effects on gene expression, enzymatic action, and oxidative stress of bees. This meta-analysis is a guide for future research in this area, suggesting tests with different concentrations, methodologies, and species of bees. Added to this, the results contribute to aiding the preservation of different species of bees.

## 5.5 CONCLUSION

The present study supports the hypothesis that the exposure of bees to GLY and glyphosate-based formulations, in ecologically relevant doses or in recommended concentrations used in agricultural settings, might cause lethal effects (mortality) in these insects, since in most categories significant differences were reported between the experimental and control groups. The GLY ingestion (food), spraying and contact with GLY had a significant effect on bees. Adult bees or larvae were shown to be susceptible to the active ingredient. Chronical expositions were apparently more harmful to bees. Regarding the studied bee species, both stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Hypotrigona rufopoli*, as well as the honeybee *A. mellifera* exposed to GLY were negatively affected when compared to the control group.

## Acknowledgment

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. S.H. Sofia and C.B.R. Martinez are research fellows from The Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We thank to Universidade Estadual de Londrina (UEL) and the Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) to promote this research.

## 5.6 REFERENCES

- Abastecimento, A.-M. da C.A. e, 2020. Secretaria de Defesa Agropecuária Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos. Relatório de ingredientes ativos [WWW Document]. URL [http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit\\_cons&ingredientes\\_ativos.rdf&p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=&p\\_nm\\_comum\\_port=glifosato&p\\_id\\_grupo\\_quimico=&p\\_id\\_classe=&p\\_id\\_cultura=&p\\_tipo\\_relatorio=DETALHADO&paramform=no](http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit_cons&ingredientes_ativos.rdf&p_id_ingrediente_ativo=&p_nm_comum_port=glifosato&p_id_grupo_quimico=&p_id_classe=&p_id_cultura=&p_tipo_relatorio=DETALHADO&paramform=no) (acessado 3.26.20).
- Abati, R., Sampaio, A.R., Mendes, R., Maciel, A., Colombo, F.C., Libardoni, G., Battisti, L., Lozano, E.R., Ghisi, N.D.C., Costa-maia, F.M., Potrich, M., 2021. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>

- Abou-Shaara, H.F., Abuzeid, M.A., 2018. Effects of two herbicides on healthy and *Nosema* infected honey bee workers. *Arthropods* 7, 31–41.
- Abraham, J., Benhotons, G.S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., Abraham, J.D., 2018. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 166, 695–702. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- ADAPAR - Agência de defesa agropecuária do Paraná, 2021. Agrotóxicos no Paraná. Agrotóxicos liberados para uso no estado. [WWW Document]. URL <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/listar.asp?Cod=1639&descIngrediente=&CodIngredienteAtivo=null&CodFormulacao=null&IdRegistrante=null&CodFormaAcao=null&CodAlvo=null&CodGrupoQuimico=null&CodClassToxicologica=null&CodSituacao=null&CodClassificacao=n>
- Agresti, A., 2002. *Categorical Data Analysis*. Wiley, New York.
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021a. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. [WWW Document]. 2021. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021b. Relatórios de Produtos Formulados [WWW Document]. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M., 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.* 103, 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Allen-wardell, A.G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Cox, P.A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., Inouye, D., Jones, C.E., Kennedy, K., Kevan, P., Medellin, R., Medellin-morales, S., Nabhan, G.P., Pavlik, B., Tepedino, V., Torchio, P., Walker, S., 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields 12, 8–17.
- Alves, G.S., Cunha, J.P.A.R. da, 2014. Field data and prediction models of pesticide spray drift on coffee crop. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 49, 622–629. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800006>
- Amarante Junior, O.P., Dos Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova* 25, 589–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400014>

- Araújo, R. dos S., Bernardes, R.C., Martins, G.F., 2021. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. *Sci. Total Environ.* 763, 142980. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142980>
- Bacaxixi, P., Bueno, C.E.M.S., Ricardo, H.A., Epiphanyo, P.D., Silva, D.P., Barros, B.M.C., Silva, T.F., Bosquê, G.G., Lima, F.C.C., 2011. a Importância Da Apicultura No Brasil. *Rev. Científica Eletrônica Agron.* 5.
- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 462–470. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>
- Balbuena, M.S., Tison, L., Hahn, M.L., Greggers, U., Menzel, R., Farina, W.M., 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* 218, 2799–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>
- Baptista, A.P.M., Carvalho, G.A., Carvalho, S.M., Carvalho, C.F., Bueno Filho, J.S. de S., 2009. Toxicity of pesticides used in citrus crop to *Apis mellifera*. *Cienc. Rural* 39, 955–961. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000049>
- Barbosa, D.B., Crupinski, E.F., Silveira, R.N., Limberger, D.C.H., 2017. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 3, 694–703. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Batra, S.W.T., 1984. Solitary bees. *Sci. Am.* 250, 120–127.
- Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A.R., de Castilhos Ghisi, N., Costa-Maia, F.M., Abati, R., dos Reis Martinez, C.B., Sofia, S.H., 2021. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Sci. Total Environ.* 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>
- Belsky, J., Joshi, N.K., 2020. Effects of Fungicide and Herbicide Chemical Exposure on *Apis* and Non-*Apis* Bees in Agricultural Landscape. *Front. Environ. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>
- Benachour, N., Séralini, G.E., 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 97–105. <https://doi.org/10.1021/tx800218n>

- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benzie, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Food Sci. Nutr.* 47, 233–261.
- Beringer, J., 2019. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 5, 18–27. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>
- Beyaert, L., Greggers, U., Menzel, R., 2012. Honeybees consolidate navigation memory during Sleep. *J. Exp. Biol.* 215, 3981–3988. <https://doi.org/10.1242/jeb.075499>
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (80-. ). 313, 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Blacquièrè, T., van der Steen, J.J.M., 2017. Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Manag. Sci.* 73, 1299–1304. <https://doi.org/10.1002/ps.4583>
- Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., Delatte, H., 2019. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., Chagnon, M., 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>
- Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.
- Bovi, T.S., Zaluski, R., Orsi, R. de O., 2018. Toxicity and motor changes in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 239–245. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820150191>
- Brovini, E.M., de Deus, B.C.T., Vilas-Boas, J.A., Quadra, G.R., Carvalho, L., Mendonça, R.F., Pereira, R. de O., Cardoso, S.J., 2021. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Sci. Total Environ.* 771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>

- Brühl, C.A., Zaller, J.G., 2019. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. *Front. Environ. Sci.* 7, 2013–2016. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>
- Burt, E.T., Wigglesworth, V.B., 1966. The principles of insect physiology, *The Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.2307/2496>
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Calderón, R.A., van Veen, J.W., Sommeijer, M.J., Sanchez, L.A., 2010. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 50, 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9325-4>
- Calderone, N.W., 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS One* 7, 24–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>
- Calfee, E., Agra, M.N., Palacio, M.A., Ramírez, S.R., Coop, G., 2020. Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009038>
- Canciani, M., Arnellos, A., Moreno, A., 2019. Revising the superorganism: An organizational approach to complex eusociality. *Front. Psychol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02653>
- Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E., 2020. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189, 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
- Carraschi, S.P., Cubo, P., Schiavetti, B.L., Shiogiri, N.S., da Cruz, C., Pitelli, R.A., 2011. Toxic effects of phytosanitary surfactants for jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Sci. - Biol. Sci.* 33, 191–196. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v33i2.6252>
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Chaves, A., Faita, M.R., Ferreira, B.L., Poltronieri, A.S., Nodari, R.O., 2020. Effects of glyphosate-based herbicide on royal jelly production of *Apis mellifera*

- (Hymenoptera: Apidae) in field conditions. *J. Apic. Res.* 60, 277–279.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844463>
- Chiari, W.C., de Toledo, V. de A.A., Hoffmann-Campo, C.B., Rúvolo-Takasusuki, M.C.C., de Toledo, T.C.S. de O.A., Lopes, T. da S., 2008. Polinização por apis mellifera em soja transgênica [Glycine max (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. *Acta Sci. - Agron.* 30, 267–271.
- Chiari, W.C., De Toledo, V.D.A.A., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Braz De Oliveira, A.J., Sakaguti, E.S., Attencia, V.M., Costa, F.M., Mitsui, M.H., 2005. Pollination of Soybean (Glycine max L. Merrill) by Honeybees (Apis mellifera L.). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 31–36. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000100005>
- Chmiel, J.A., Daisley, B.A., Pitek, A.P., Thompson, G.J., Reid, G., 2020. Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: A role for probiotics as mediators of environmental stress. *Front. Ecol. Evol.* 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00022>
- Christensen, R.H.B., 2019. Ordinal-Regression Models for Ordinal Data. R package version 2019. [WWW Document]. URL <https://cran.r-project.org/package=ordina>
- Classen, A., Peters, M.K., Ferger, S.W., Helbig-Bonitz, M., Schmack, J.M., Maassen, G., Schleuning, M., Kalko, E.K.V., Böhning-Gaese, K., Steffan-Dewenter, I., 2014. Complementary ecosystem services provided by pest predators and pollinators increase quantity and quality of coffee yields. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3148>
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x>
- Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB), 2020. Acompanhamento da Safra Brasileira - CAFÉ Quarto levantamento | DEZEMBRO 2020. *Obs. Agrícola* 5, 1–45.
- CONAB, 2019. Acompanhamento da safra brasileira de café. Quarto Levant. 5, 1–44.
- CONAB, 2017. A Cultura do Café: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2008 a 2017. *Camp. Nac. Abast.* 12, 54.
- Conagin, C.H.T.M., Mendes, A.J.T., 1961. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de Coffea: auto-incompatibilidade em Coffea canephora. *Pesqui. Citológicas e Genéticas* 20, 18.

- Cruz-Landim, C. da., 2009. *Abelhas: Morfologia e função dos sistemas*, UNESP. ed. São Paulo.
- Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* 17, 491. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(02\)02600-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(02)02600-9)
- D'Avila, M., Marchini, L.C., 2005. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. *B. Industr. anim.* 62, 79–90.
- Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Wu, Y., Liu, Y., Diao, Q., 2018. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7786–7793. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212>
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., Neumann, P., 2012. Colony collapse disorder in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
- De Andréa, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M.B., Tedeschi Savoy, V.L., 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 38, 1329–1335. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001100012>
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2020. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Dick, R.E., Quinn, J.P., 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 545–550. <https://doi.org/10.1007/BF00218464>
- Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D., Hauptfear, E.A., 2010. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties, in: *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. p. 344.
- Doner, L.W., 1977. The sugars of honey—A review. *J. Sci. Food Agric.* 28, 443–456.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>

- El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M.L., de Graaf, D.C., Saegerman, C., 2020. Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Sci. Total Environ.* 704, 135312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135312>
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and colony collapse disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134–136. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Fagard, R.H., Staessen, J.A., LutgardeThijs, 1996. Advantages and disadvantages of the meta-analysis approach. *J. Hypertens.* 14, 9–13. <https://doi.org/10.1097/00004872-199609002-00004>
- Faghani, M., Rahimian, Y., 2018. Effect of glyphosate on honey bee (*Apis Mellifera*) performance 7, 77–81.
- Faita, M.R., Cardozo, M.M., Amandio, D.T.T., Orth, A.I., Nodari, R.O., 2020. Glyphosate-based herbicides and *Nosema* sp. microsporidia reduce honey bee (*Apis mellifera* L.) survivability under laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 59, 332–342. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1736782>
- Faita, M.R., Oliveira, E. de M., Alves, V.V., Orth, A.I., Nodari, R.O., 2018. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere* 211, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.189>
- Farah, A., Santos, T.F. dos, 2015. The Coffee Plant and Beans: An Introduction, in: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., p. 5–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>
- Fathi, M.A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., Li, C., 2020. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 16865–16875. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08269-3>
- Ferrão, R., Fonseca, A.F., Ferrão, M.A.G., Muner, L., 2017. *Café Conilon*, 2º. ed. Vitória, ES. INCAPER.

- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–533.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Filho, D.B.S., Paranhos, R., Júnior, J.A.S., Rocha, E.C., Alves, D.F., 2014. O que é, para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teor. e Pesqui.* 23, 205–228.  
<https://doi.org/10.4322/tp.2014.018>
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Garibaldi, L.A., Steffan-dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., 2014. Honey Bee Abundance. *Science* (80-. ). 339, 1608–1611.
- Ghisi, N. de C., Oliveira, E.C. de, Prioli, A.J., 2016. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* 145, 42–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>
- Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M., 2015a. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46, 209–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Giannini, T.C., Cordeiro, G.D., Freitas, B.M., Saraiva, A.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2015b. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108, 849–857.  
<https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2)
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Glass, G. V., 1976. Primary , Secondary , 5, 3–8.
- Gomes, I.N., Ingrid Castelan Vieira, K., Moreira Gontijo, L., Canto Resende, H., 2020. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. *Ecotoxicology* 29, 97–107.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>

- Gonalons, C.M., Farina, W.M., 2018. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.176644>
- Gong, Y., Diao, Q., 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 0–1. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., 2012. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.* 142, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-. ). 347. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Graffigna, S., Marrero, H.J., Torretta, J.P., 2020. Glyphosate commercial formulation negatively affects the reproductive success of solitary wild bees in a Pampean agroecosystem. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00816-8>
- Gregorc, A., Ellis, J., 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol* 99, 200–207.
- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M., Maleszka, R., Belzunces, L.P., 2001. Contrasting effects of Imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 76, 183–191. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3995>
- Guzman-Novoa, E., Morfin, N., De la Mora, A., Macías-Macías, J.O., Tapia-González, J.M., Contreras-Escareño, F., Medina-Flores, C.A., Correa-Benítez, A., Quezada-Euán, J.J.G., 2020. The Process and Outcome of the Africanization of Honey Bees in Mexico: Lessons and Future Directions. *Front. Ecol. Evol.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.608091>
- Han, F., Wallberg, A., Webster, M.T., 2012. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2, 1949–1957. <https://doi.org/10.1002/ece3.312>
- Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2015. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>

- Herbert, L.T., Vázquez, D.E., Arenas, A., Farina, W.M., 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217, 3457–3464. <https://doi.org/10.1242/jeb.109520>
- Hernández, J., Riveros, A.J., Amaya-Márquez, M., 2021. Sublethal doses of glyphosate impair olfactory memory retention, but not learning in the honey bee (*Apis mellifera scutellata*). *J. Insect Conserv.* 25, 683–694. <https://doi.org/10.1007/s10841-021-00335-6>
- Hung, K.L.J., Kingston, J.M., Albrecht, M., Holway, D.A., Kohn, J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Hyne, R. V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 366–374. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00119-7)
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2017. Some organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis, 2020. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2020. [WWW Document]. 2020. URL <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>
- IBAMA - Ministério do meio ambiente, 2020. Relatórios de comercialização de agrotóxicos [WWW Document]. URL <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA., 2020. Pesquisa pecuária municipal [WWW Document]. URL <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019> (acessado 9.27.21).
- Imperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D. de A., Saraiva, A.M., 2012. Polinizadores e Polinização – um Tema Global, in: *Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo, p. 489.
- IPBES, 2016. *Pollination and, Science*.
- Israili, Z.H., 2014. Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* 21, 304–323. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b>

- Johnson, R., 2013. Honey bee colony collapse disorder. *Honey Bees Colony Collapse Disord. Sel. Anal.* 69–92.
- Johnson, R.M., 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>
- Jong, D. De, 1996. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World* 77, 67–70. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099289>
- Jumarie, C., Aras, P., Boily, M., 2017. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere* 168, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete samples. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M., 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83>
- Kirkwood, R.C., Hetherington, R., Reynolds, T.L., Marshall, G., 2000. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): Influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest Manag. Sci.* 56, 359–367. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S)
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A.B., Lihoreau, M., 2017. Why bees are so vulnerable to environmental stressors 32, 268–278.
- Kluser, S., Peduzzi, P., 2007. Global pollinator decline : A literature review. *Conserv. Ecol.* 1–10.
- Krimsky, S., 2021. Can glyphosate-based herbicides contribute to sustainable agriculture? *Sustain.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.3390/su13042337>
- Kwong, W.K., Mancenido, A.L., Moran, N.A., 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci.* 4. <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Kwong, W.K., Moran, N.A., 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Latini, A.O., Silva, D.P., Souza, F.M.L., Ferreira, M.C., Moura, M.S. de, Suarez, N.F., 2020. Reconciling coffee productivity and natural vegetation conservation in an agroecosystem landscape in Brazil. *J. Nat. Conserv.* 57. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125902>

- Ledoux, M.L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L., Lee, S.O., 2020. Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control* 109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106859>
- Lefebvre, C., Manheimer, E., Glanville, J., 2008. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. <https://doi.org/10.1002/9781119536604>
- Lehmann, D.M., Camp, A.A., 2021. A systematic scoping review of the methodological approaches and effects of pesticide exposure on solitary bees. *PLoS One* 16, e0251197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251197>
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Liao, L.H., Wu, W.Y., Berenbaum, M.R., 2017. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Sci. Rep.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15066-5>
- Libardoni, G., Neves, P.M.O.J., Abati, R., Sampaio, A.R., Costa-Maia, F.M., de Souza Vismara, E., Lozano, E.R., Potrich, M., 2021. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82874-1>
- Lima, M.C. de, Rocha, S. de A., 2012. Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil, IBAMA (Ins. ed. Brasília - DF).
- Lima, É.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 37, 293–303.
- Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., 2016. Agrochemical-induced stress instigates bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J Comp Physiol A* 202, 1–15.
- Lopes, M.P., Fernandes, K.M., Vaner, H., Tomé, V., 2017. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest Manag. Sci.*
- Lovatto, P.A., Lehnen, C.R., Andretta, I., Carvalho, A.D., Hauschild, L., 2007. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 285–294. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007001000026>
- Luiz, A.J., 2002. Meta-Análise: Definição, Aplicações E Sinergia Com Dados Espaciais. *Cad. Ciência Tecnol.* 19, 407–428.
- Luo, Q.H., Gao, J., Guo, Y., Liu, C., Ma, Y.Z., Zhou, Z.Y., Dai, P.L., Hou, C.S., Wu,

- Y.Y., Diao, Q.Y., 2021. Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. *Sci. Rep.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80445-4>
- Mackos, A.R., Varaljay, V.A., Maltz, R., Gur, T.L., Bailey, M.T., 2016. Role of the intestinal microbiota in host responses to stressor exposure, 1<sup>o</sup> ed, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.002>
- Maini, S., Medrzycki, P., Porrini, C., 2010. The puzzle of honey bee losses: A brief review. *Bull. Insectology* 63, 153–160.
- Marques, J.G. de C., Veríssimo, K.J. da S., Fernandes, B.S., Ferreira, S.R. de M., Montenegro, S.M.G.L., Motteran, F., 2021. Glyphosate: A Review on the Current Environmental Impacts from a Brazilian Perspective. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 107, 385–397. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03295-4>
- Mesnage, R., Moesch, C., Grand, R. Le, Lauthier, G., Vendômois, J.S. de G., Séralin, S.G.-E., 2012. Glyphosate Exposure in a Farmer's Family. *Am. J. Hum. Genet.* 3, 1001–1003. <https://doi.org/10.1086/340363>
- Michener, C., 2007. *The Bees of the World*. Baltimore.
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees: a comparative study*, Harvard Un. ed.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>
- Monquero, P.A., Oliveira, A.S., 2018. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas? *Rev. Bras. Herbic.* 1, 95. <https://doi.org/10.7824/rbh.v1i1.533>
- Morais, M.M., Jong, D. De, Message, D., Gonçalves, L.S., 2012. Perspectivas e Desafios para o Uso das Abelhas *Apis mellifera* como Polinizadores no Brasil, in: *Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo, p. 489.
- Moreno, N.C., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.012>
- Morowati, M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide

- glyphosate. *Environmentalist* 20, 105–111.  
<https://doi.org/10.1023/A:1006704009184>
- Motta, E.V.S., Mak, M., De Jong, T.K., Powell, J.E., O'Donnell, A., Suhr, K.J., Riddington, I.M., Moran, N.A., 2020b. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E.V.S., Moran, N.A., 2020. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: Effects of intensity, duration, and timing of exposure. *Systems* 5, 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00268-20>
- Motta, E.V.S., Raymann, K., Moran, N.A., 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Murawska, A., Migdał, P., Roman, A., 2021. Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. *Agric.* 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070648>
- Nagy, K., Duca, R.C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P.T.J., Godderis, L., Ádám, B., 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations, *Environmental Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
- Nocelli, R.C.F., Soares, S.M., Monquero, P., 2019. Effects of herbicides on the survival of the brazilian native bee *Melipona scutellaris* latreille, 1811 (hymenoptera: apidae). *Planta Daninha* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100>
- Odemer, R., Alkassab, A.T., Bischoff, G., Frommberger, M., Wernecke, A., Wirtz, I.P., Pistorius, J., Odemer, F., 2020. Chronic high glyphosate exposure delays individual worker bee (*Apis mellifera* L.) development under field conditions. *Insects* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects11100664>
- Oliveira, M.L. de, Cunha, J.A., 2005. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amaz.* 35, 389–394. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672005000300013>
- Olkin, I., 1995. Statistical and theoretical considerations in meta-analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 48, 133–146. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)00136-E](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)00136-E)
- Olkin, L., 1992. Meta-analysis: methods for combining independent studies. *Stat. Sci.*

7.

- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Oost, R. Van Der, Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.-D., Ascher, J.S., 2020. Global patterns and drivers of bee distribution. *Curr. Biol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>
- Parker, R., Melathopoulos, A.P., White, R., Pernal, S.F., Guarna, M.M., Foster, L.J., 2010. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011096>
- Pazini, J.B., Pasini, R.A., Rakes, M., de Armas, F.S., Seidel, E.J., da S Martins, J.F., Grützmacher, A.D., 2017. Toxicity of pesticide tank mixtures from rice crops against *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). *Neotrop. Entomol.* 46, 461–470. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0483-5>
- Pérez, L., Solange, M., Mir, L., 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. *Herbic. Environ.* <https://doi.org/10.5772/12877>
- Peruzzolo, M.C., Cruz, B.C.F. da, Ronqui, L., 2019. Polinização e produtividade do café no Brasil. *Pubvet* 14, 1–6. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a317.1-6>
- Pignati, W.A., e Lima, F.A.N. de S., de Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.D.C., Pignatti, M.G., 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. *Cienc. e Saude Coletiva* 22, 3281–3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>
- Pinto, M.A., Rubink, W.L., Patton, J.C., Coulson, R.N., Johnston, J.S., 2005. Africanization in the United States: Replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. *Genetics* 170, 1653–1665. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035030>
- Pires, C.S.S., de Mello Pereira, F., do Rêgo Lopes, M.T., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, É.W., 2016. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 422–442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>

- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753–2766. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>
- Qiu, S., Fu, H., Zhou, R., Yang, Z., Bai, G., Shi, B., 2020. Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109846. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>
- Quigley, T.P., Amdam, G. V., Harwood, G.H., 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 35, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.08.012>
- Raine, B.N.E., 2018. of Bumblebees Inside the Nest. *Science (80-. )*. 362, 643–645.
- Reilly, J.R., Artz, D.R., Biddinger, D., Bobiwash, K., Boyle, N.K., Brittain, C., Brokaw, J., Campbell, J.W., Daniels, J., Elle, E., Ellis, J.D., Fleischer, S.J., Gibbs, J., Gillespie, R.L., Gundersen, K.B., Gut, L., Hoffman, G., Joshi, N., Lundin, O., Mason, K., McGrady, C.M., Peterson, S.S., Pitts-Singer, T.L., Rao, S., Rothwell, N., Rowe, L., Ward, K.L., Williams, N.M., Wilson, J.K., Isaacs, R., Winfree, R., 2020. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators: Pollination limitation in US crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 2–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>
- Richmond, M.E., 2018. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J. Environ. Stud. Sci.* 8, 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>
- Rissoli, R.Z., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Rantin, F.T., McKenzie, D.J., Kalinin, A.L., 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 156, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.083>
- Robertis, E.M., Hib, J., 2017. *Biologia celular e molecular*, 16<sup>o</sup> ed, Rev. Elet. Cient.
- Rolando, C.A., Baillie, B.R., Thompson, D.G., Little, K.M., 2017. The risks associated with glyphosate-based herbicide use in planted forests. *Forests* 8, 1–26. <https://doi.org/10.3390/f8060208>
- Rosanigo, M.P., Marrero, H.J., Torretta, J.P., 2020. Limiting resources on the reproductive success of a cavity-nesting bee species in a grassland agroecosystem. *J. Apic. Res.* 59, 583–591.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1726034>

- Ruiz-Toledo, J., Sánchez-Guillén, D., 2014. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta zoológica Mex.* 30, 408–413.
- Russell, L., 2020. R Package 'emmeans': Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means [WWW Document]. URL <https://github.com/rvlenth/emmeans>
- Ruttner, F., 1992. *Naturgeschichte der Honigbienen*, Ehrenwirth. ed. München.
- Ruttner, F., Tassencourt, L., Louveaux, J., 1978. Biometrical-satistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381.
- Samsel, A., Seneff, S., 2013. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy* 15, 1416–1463. <https://doi.org/10.3390/e15041416>
- Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Saturni, F.T., Jaffé, R., Metzger, J.P., 2016. Landscape structure influences bee community and coffee pollination at different spatial scales. *Agric. Ecosyst. Environ.* 235, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.008>
- Schneider, S.S., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, D.R., 2004. The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 351–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123359>
- Seide, V.E., Bernardes, R.C., Pereira, E.J.G., Lima, M.A.P., 2018. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Pollut.* 243, 1854–1860. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar, R.D., Dar, O.I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Silva, G.M., Finley, D., Vogel, C., 2015. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 116–123. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2955>
- Souza, A.P.F., Rodrigues, N.R., Reyes, F.G.R., 2021. Glyphosate and

- aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 14, 40–47. <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1855676>
- Stein, K., Coulibaly, D., Stenchly, K., Goetze, D., Porembski, S., Lindner, A., Konaté, S., Linsenmair, E.K., 2017. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17970-2>
- Straw, E.A., Carpentier, E.N., Brown, M.J.F., 2021. Roundup causes high levels of mortality following contact exposure in bumble bees. *J. Appl. Ecol.* 58, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13867>
- Tang, Q., Tang, J., Ren, X., Li, C., 2020. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ. Pollut.* 261, 114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Therneau, T.M., 2020. survival: A Package for Survival Analysis in R. R Packag. version 2.38.
- Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von Mérey, G., 2014. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 463–470. <https://doi.org/10.1002/ieam.1529>
- Tomé, H.V.V., Schmehl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S.M., Ravaiano, S. V., Guedes, R.N.C., Martins, G.F., Ellis, J.D., 2020. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environ. Pollut.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113420>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vázquez, D.E., Balbuena, M.S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., Farina, W.M., 2020a. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>
- Vázquez, D.E., Ilina, N., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M., 2018. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205074>
- Vázquez, D.E., Latorre-Estivalis, J.M., Ons, S., Farina, W.M., 2020b. Chronic exposure

- to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environ. Pollut.* 261, 114148. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114148>
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A. V., Weaver, D., Tsutsui, W.D., 2006. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* (80-. ). 314, 642–645. <https://doi.org/10.1126/science.1132772>
- Wiley, J., Sons, H.I., 2010. A textbook of modern toxicology. New Jersey e Canada.
- Wiley, J., Sons, I., 2004. The honey bee colony as a superorganism.
- Willmer, P.G., Stone, G.N., 1989. Incidence of entomophilous pollination of lowland coffee (*Coffea canephora*); the role of leaf cutter bees in Papua New Guinea. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 113–124. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb02380.x>
- WorldAtlas, 2021. Top Pesticide Using Countries [WWW Document]. URL <https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H., 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101, 1743–1748. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1743>
- Yu, S.J., Robinson, F.A., Nation, J.L., 1984. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 360–368. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90029-4)
- Zaluski, R., Kadri, S.M., de Souza, E.A., da Silva, V.M.C., da Silva, J.R.C., Rodrigues-Orsi, P., Orsi, R. de O., 2014. Africanized honeybees in urban areas: A public health concern. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 659–662. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0254-2013>
- Zattara, E.E., Aizen, M.A., 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>
- Zgurzynski, M.I., Lushington, G.H., 2019. Glyphosate impact on *Apis mellifera* navigation: A combined behavioral and cheminformatics study. *Pharmacol. Toxicol.* 7, 806–824.
- Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with

China as a focus 1, 125–144.

- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., Wang, H., Liu, Z., Guo, X., Xu, B., 2020. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Sci. Total Environ.* 744, 140819. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140819>
- Zhu, Y.C., Adamczyk, J., Rinderer, T., Yao, J., Danka, R., Luttrell, R., Gore, J., 2015. Spray Toxicity and Risk Potential of 42 Commonly Used Formulations of Row Crop Pesticides to Adult Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 108, 2640–2647. <https://doi.org/10.1093/jee/tov269>
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J., Luttrell, R., 2017a. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176837>
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J., Luttrell, R., 2017b. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421>

## 6 CAPÍTULO 3: TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO FORMULADO PARA *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

### RESUMO

Inicialmente os produtos a base de glifosato (GLY) eram considerados como não tóxicos ou ligeiramente tóxicos para as abelhas, mas pesquisas recentes mostraram que estes produtos podem causar a mortalidade ou desencadear efeitos subletais nestes insetos. O Roundup Transorb R<sup>®</sup> (RT) é um dos formulados à base de GLY comercializados no Brasil, usado em diversas culturas, o que requer estudos sobre sua toxicidade para abelhas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar, em condições de laboratório, os efeitos letais e subletais do RT para operárias adultas (campeiras) de *A. mellifera* africanizada. Para tal, foram realizados dois bioensaios com as abelhas africanizadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (T1 - controle, T2 – 25% GLY, T3 – 50% GLY, T4 – 75% GLY e T5 GLY – 100% dose recomendada). Os bioensaios foram feitos da seguinte forma: (1) Exposição aguda por via oral e tópica, avaliando-se a mortalidade, efeitos na capacidade de voo, deslocamento vertical e locomoção (neste último apenas para contaminação oral), composto por cinco repetições e 10 abelhas por repetição; (2) Exposição crônica por via oral e pulverização, avaliando-se a mortalidade, para ambas as vias de contaminação, e os danos na espessura do epitélio do intestino médio quando contaminadas por via oral, composto por cinco repetições e 20 abelhas por repetição. Os resultados mostraram que o RT pode causar mortalidade e danificar na espessura do epitélio do intestino médio quando as abelhas foram expostas cronicamente por via oral. Além disso, quando expostas de forma aguda por via oral, as abelhas tiveram redução na capacidade de caminhada. O RT não afetou os outros parâmetros avaliados. Assim, conclui-se que o GLY formulado RT pode afetar a sobrevivência, morfologia do intestino médio e comportamento de *A. mellifera*.

### 6.1 INTRODUÇÃO

A polinização, processo responsável pela fecundação das angiospermas, é um serviço fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas terrestres, sendo essencial para a conservação e manutenção da diversidade da fauna e flora do planeta (Kearns et al., 1998; Kevan e Viana, 2003). Aproximadamente 90% das angiospermas têm a polinização mediada por animais, com

destaque para as abelhas e outros insetos (Kearns et al., 1998; Kevan e Viana, 2003; Ollerton et al., 2011). No caso das culturas agrícolas, a importância do papel dos polinizadores, como abelhas, têm sido apontada por diferentes autores, nas últimas décadas (Kearns et al., 1998; Klein et al., 2007; Aizen et al., 2009; Gallai et al., 2009; Stein et al., 2017). De acordo com Stein et al. (2017), a polinização por abelhas e outros insetos, é responsável não apenas pela reprodução sexuada das plantas, mas também por manter variabilidade genética dos cultivos agrícolas, reduzindo as chances de depressão endogâmica e aumentando a resiliência do sistema, garantindo, assim, a estabilização das safras e do rendimento das culturas.

Estimativas da influência dos polinizadores no lucro relacionado à produtividade agrícola têm revelado números marcantes, da ordem de centenas de bilhões de dólares (Gallai et al., 2009; IPBES, 2016). Apenas para a América do Sul, o valor estimado foi de, aproximadamente, US\$ 13,45 bilhões (Freitas e Silva, 2015). No caso do Brasil, das 141 espécies cultivadas para alimentação humana, em torno de 85 dependem da polinização para aumento da produtividade, contribuindo para um valor anual estimado de, aproximadamente, US\$ 45 bilhões (Giannini et al., 2015). Apesar da importância dos polinizadores, fortes evidências apontam para o declínio em suas populações no mundo todo (Biesmeijer et al., 2006; Dainat et al., 2012; Ellis et al., 2010; Johnson, 2013; Wagner, 2020). Embora as causas para este fato ainda não sejam totalmente compreendidas o uso excessivo de agrotóxicos certamente é uma das principais causas, frequentemente, apontadas por diferentes autores (Brühl e Zaller, 2019; Goulson et al., 2015; Kearns et al., 1998; Sánchez-Bayo e Wyckhuys, 2019; Zattara e Aizen, 2021).

O Brasil possui um clima que favorece a produção agrícola, sendo o segundo maior exportador de produtos agrícolas no mundo (IBAMA, 2020), sendo um dos países com maior consumo anual de agrotóxicos no mundo (WorldAtlas, 2021). A soja (com 32,2 milhões de hectares – Mha - de área plantada), o milho (com 15,8 Mha) e a cana-de-açúcar (com 10,1 Mha) representam as maiores safras brasileiras, consumindo em média de 17,7 L, 7,4 L e 4,8 L de agrotóxicos por hectare, respectivamente (Brovini et al., 2021; Pignati et al., 2017). Fatores como o uso de cultivos transgênicos, aumento de pragas agrícolas nas lavouras, isenção de tributos e legislação mais permissiva em comparação com países da União Europeia, possivelmente contribuíram para o aumento no consumo de agrotóxicos (Bombardi, 2017; Pignati et al., 2017).

Entre os agrotóxicos, os produtos a base de Glifosato (GLY) são os mais vendidos no mundo equivalendo a 71,6% dos pesticidas comercializados (Benbrook, 2016) e no Brasil representando 38,61% (IBAMA, 2020). Existem várias formulações a base de GLY, as quais contêm misturas com surfactantes para potencializar a penetração no vegetal. Estudos têm

mostrado que soluções formuladas de GLY são mais tóxicas para a saúde humana do que o GLY sozinho, indicando a necessidade de mais estudos relacionados com as abelhas (Ghisi et al., 2016; Luo et al., 2021; Nagy et al., 2020). No Brasil, o Roundup Transorb R® (RT) é um dos produtos formulados utilizados nas lavouras de soja, trigo, milho, café, entre outras (ADAPAR, 2021; AGROFIT, 2021). Tal produto tem em sua formulação ácido de N-(fosfonometil) glicina (480 g/L), Sal de Isopropilamina (648 g/L) e ingredientes inertes (549 g/L), que neste último caso, constituem o surfactes. Alguns estudos demonstraram que o RT pode desencadear efeitos letais e subletais em peixes e anfíbios (Goulson et al., 2015; Modesto e Martinez, 2010; Moreno et al., 2014; Rissoli et al., 2016). Entretanto, no caso de abelhas e outros invertebrados, ainda não se tem informações sobre os possíveis efeitos do herbicida RT.

*Apis mellifera* L. é uma das principais espécies de abelhas contribuindo para o aumento da produtividade de vários cultivos agrícolas, como a soja (Aizen et al., 2009; Chiari et al., 2008, 2005), economicamente importante para o Brasil. Entre as variedades de *A. mellifera*, a abelha africanizada tornou-se comum na América do Sul e no sudoeste dos EUA, surgindo pela hibridização de *A. mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 e subespécies europeias. Assim *A. mellifera* africanizada se adaptou as condições climáticas e tornou-se fundamental para estes locais (Pinto et al., 2005).

Apesar de vários estudos terem reconhecido o GLY e seus produtos formulados como atóxicos ou ligeiramente tóxicos para animais (Dill et al., 2010; Giesy et al., 2000; Rolando et al., 2017), pesquisas têm mostrado que produtos formulados à base de GLY podem prejudicar funções morfofisiológicas das abelhas, causando efeitos letais em várias espécies por contaminação oral, contato e pulverização (Battisti et al., 2021). Além disso, a exposição das abelhas a estes produtos pode alterar a expressão gênica e funcionamento enzimático (Vázquez et al., 2020b; Zhu et al., 2017a), prejudicar a capacidade cognitiva e sucesso de voo (Balbuena et al., 2015), bem como a frequência do sono (Vázquez et al., 2020a), além de causar problemas no desenvolvimento (Odemer et al., 2020).

Levantamento feito na literatura aponta a ausência de estudos avaliando os efeitos do RT em abelhas, incluindo *A. mellifera* africanizada, a despeito do amplo uso deste formulado até recentemente no Brasil, onde a mesma encontra-se amplamente distribuída. Considerando que as abelhas entram em contato direto com GLY formulado nas culturas agrícolas e ficam expostas a doses ambientalmente relevantes (Battisti et al., 2021; Luo et al., 2021), ainda são necessários mais estudos investigando como tais formulados podem afetar as abelhas. Por este motivo, pesquisas avaliando os possíveis efeitos tóxicos do RT para *A. mellifera* são de extrema

importancia para compreender os impactos deste herbicida sobre estas abelhas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos letais (exposição aguda e crônica) e subletais (caminhamento, deslocamento vertical, queda e histologia do intestino médio) do Roundup Transorb R® em *A. mellifera* africanizada, em condições de laboratório.

## 6.2 METODOLOGIA

### 6.2.1 Obtenção de *Apis mellifera* africanizada e Roundup Transorb R® (RT)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico (LABCON) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV). As abelhas campeiras de *A. mellifera* africanizada foram coletadas no apiário da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UNEPE – Apicultura da UTFPR-DV). Para a coleta, utilizou-se uma gaiola de cloreto de polivinila (PVC – 20 cm de altura X 10 cm de diâmetro) foi usado para coletar as abelhas que haviam retornado do campo. O apiário contém 52 colônias, cada uma formada pela caixa (cinco quadros) e sobrecaixa (cinco quadros) com aproximadamente 9 a 12 mil indivíduos (Apêndice A). Destas, selecionou-se dez colônias de forma aleatória, misturando as abelhas antes da montagem dos experimentos, por causa da variabilidade genética.

O herbicida utilizado no experimento foi o produto Roundup Transorb R® (RT), obtido por meio de empresa de comercialização. Este produto é composto por sal de isopropilamina de GLIFOSATO (648 g/L), ácido equivalente N-(fosfometil) glicina (480 g/L) e Ingredientes Inertes (594 g/L). As concentrações usadas foram a recomendada pelo fabricante (100%) e mais três diluições (75%, 50% e 25%), diluídas a partir da dose recomendada (Tabela 1).

Tabela 1: Produto comercial, composição, dosagem, principais culturas para qual é recomendado e tratamentos utilizados.

Produto	Tratamentos	Concentrações			Culturas (Principais)
		Glifosato	a.e <sup>1</sup>	i.i <sup>2</sup>	
Roundup Transorb R® (RT)	T1 – Controle (água)	-	-	-	Café, Citros,
	T2 (25% <sup>2</sup> ) - 3,75 mL/L	T2 – 2,43 g/L	T2 – 1,80 g/L	T2 – 2,23 g/L	Eucalipto,
	T3 (50% <sup>2</sup> ) - 7,5 mL/L	T3 – 4,86 g/L	T3 – 3,60 g/L	T3 – 4,46 g/L	Algodão,
	T4 (75% <sup>2</sup> ) - 11,25 mL/L	T4 – 7,29 g/L	T4 – 5,40 g/L	T4 – 6,68 g/L	Milho, soja,
	T5 (100% <sup>1</sup> ) - 15 mL/L	T5 – 9,72 g/L	T5 – 7,20 g/L	T5 – 8,91 g/L	arroz, cana-de-açúcar

Dose indicada: 1 – 4 L/há; Volume de água: 200 L/ha

<sup>1</sup>Ácido equivalente

<sup>2</sup>Ingredientes Inertes

<sup>3</sup>Dose recomendada pelo fabricante = 100%

<sup>4</sup>Diluições feitas a partir da dose recomendada = 25%, 50% e 75%

Fonte: (AGROFIT, 2021)

## 6.2.2 Bioensaio de sobrevivência de *A. mellifera* exposta ao RT

### 6.2.2.1 Exposição aguda (ingestão e tópica) de *A. mellifera* exposta ao RT

Para os bioensaios de exposição aguda (oral e tópica) das campeiras ao RT utilizou-se os protocolos da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 1998a, 1998b). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (T1 - controle, T2 – 25% GLY, T3 – 50% GLY, T4 – 75% GLY e T5 GLY – 100% dose recomendada), descritos na tabela 1, cada um com cinco repetições e dez abelhas por repetição, totalizando 50 abelhas por tratamento.

Para avaliar a exposição oral ao RT, campeiras de *A. mellifera* foram coletadas na entrada da colmeia e levadas ao LABCON da UTFPR-DV, e ficaram sem alimento por duas horas. Posteriormente, dez abelhas anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por até 120 segundos, foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) desinfetadas, e cobertas com *voil*. No interior de cada gaiola foram inseridos recipientes contendo dieta composta por água e açúcar (proporção 1:1). Para cada tratamento, as concentrações foram diluídas na dieta, e oferecidas em recipientes plásticos (1 cm de altura x 2.5 cm de diâmetro), com capacidade para 2 mL. Estes recipientes foram previamente pesados, quando com a presença da dieta foi coberto com tela anti-afídica e então fixados na parte interna de cada gaiola.

Depois de 4 horas, os recipientes com as dietas restantes foram retirados, colocando um novo recipiente contendo a dieta sem o RT. Durante a troca, observou-se se em algum tratamento não havia sido consumido a dieta durante as 4 horas. Nesse caso, os recipientes com RT permaneceram por mais 2 horas até ser realizada a troca, conforme recomendação da OECD.

Para avaliação da exposição tópica ao RT, dez abelhas anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por até 120 segundos, receberam individualmente os tratamentos por aplicação tópica, sendo transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) desinfetadas e cobertas com *voil*. Cada gaiola foi considerada uma repetição. Para isto um volume de 1 µL de solução de cada tratamento foi aplicado com uma micropipeta Kasvi® (capacidade de 1-2 µL), no lado dorsal do

toráx. Em cada gaiola foram colocados recipientes plásticos (1 cm de altura x 2.5 cm de diâmetro), com capacidade para 2 mL, contendo uma dieta de água e açúcar (proporção 1:1), sem RT

As gaiolas, contendo as abelhas expostas por via oral e tópica, foram mantidas em câmaras climatizadas ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR,  $60\% \pm 10\%$ , fotoperíodo de 12 h). A mortalidade foi registrada com 4, 24 e 48 h após a montagem dos bioensaios. As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 6.2.2.2 Exposição crônica (ingestão e pulverização)

Para avaliar a exposição crônica, por via oral e pulverização, utilizou-se a metodologia adaptada de descrita em Baptista et al. (2009) e Libardoni et al. (2021). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5) (Tabela 1). Cada tratamento consistiu em cinco repetições com 20 abelhas, totalizando 100 abelhas por tratamento.

Para exposição crônica oral ao RT, grupos de 20 abelhas foram anestesiadas, por até 120 segundos com  $\text{CO}_2$ , alocadas em gaiola de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) e recoberta com tecido *voil*. Posteriormente, uma dieta que consistia em pasta cãndi pura (açúcar de confeitaria e mel) ou pasta cãndi com os tratamentos foram colocados nas gaiolas de policloreto de vinila (PVC) (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), mantendo-as até o final do experimento, além de algodão embebido com água, umedecido diariamente.

Já para o experimento da exposição crônica por pulverização, grupos de 20 abelhas foram anestesiadas, por aproximadamente 120 segundos com  $\text{CO}_2$ , sendo transferidas para caixas gerbox (10 abelhas por caixa). Em seguida, 290  $\mu\text{L}$  das soluções preparadas para cada tratamento foram pulverizadas sobre as abelhas utilizando-se aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Fanem® de pressão constante ( $1,2\text{ kgf/cm}^2$ ) inseridas em torre de pulverização. Após duas horas de contato, os grupos de 20 abelhas foram transferidas para as gaiolas de PVC, fechadas com tecido *voil*, adicionando-se uma dieta a base de pasta cãndi e algodão embebido em água.

As gaiolas, contendo as abelhas expostas por via oral e pulverização, foram mantidas em sala climatizada ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR,  $60\% \pm 10\%$ , fotoperíodo de 12 h) (Apêndice B). A avaliação da mortalidade foi realizada 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas após a montagem dos experimentos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 6.2.3 Bioensaio de locomoção

As abelhas sobreviventes do bioensaio de exposição aguda (ingestão) foram utilizadas neste experimento. Após 48 horas, 14 abelhas (escolhidas aleatoriamente) de cada tratamento foram alocadas de forma individual em uma placa de Petri de vidro (14 cm x 1,5 cm), dispostos na base de um suporte universal acoplado a um sistema de captura de vídeo. O comportamento de cada abelha foi registrado por 10 minutos. Com o auxílio do software Bee-move (na fase de registro) foram avaliados: distância percorrida, tempo de caminhada, tempo de descanso e velocidade de caminhada, metodologia adaptada de Libardoni et al. (2021). Este bioensaio foi desenvolvido com objetivo de avaliar os possíveis efeitos de RT na capacidade de movimentação das abelhas.

### 6.2.4 Bioensaio de deslocamento vertical e retomada de voo

Dez abelhas sobreviventes do bioensaio de exposição aguda (ingestão e tóxica), escolhidas aleatoriamente, foram utilizadas nesse experimento. As variáveis avaliadas foram o deslocamento vertical e queda livre. A avaliação ocorreu em uma sala escura, utilizando uma torre vertical (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura) com luz no ápice. Dentro da torre havia cinco níveis (estratos) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Níveis (estratos) para o teste de deslocamento vertical e queda livre (retomada de voo) de operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada.

Níveis	Altura	
	Deslocamento vertical	Queda livre (retomada do voo)
I	Sem deslocamento	Queda direta para a base da torre
II	Deslocamento entre 1 e 35 cm	Queda com retomada de voo entre 1 e 35 cm
III	Deslocamento entre 35 e 70 cm	Queda com retomada de voo entre 35 e 70 cm
IV	Deslocamento entre 70 e 105 cm	Queda com retomada de voo entre 70 e 105 cm
V	Deslocamento direto para a fonte de luz	Sem queda (voo direto para a luz)

Para avaliar o deslocamento vertical, as abelhas foram posicionadas na base da torre, e por 1 min foram registrados o comportamento e a altura máxima atingida. Nesse viés, o teste de queda livre foi realizado na mesma torre. As abelhas foram soltas no ápice da torre, registrando o nível em que a abelha reiniciou o voo. Metodologia adaptada de Libardoni et al. (2021). Este bioensaio foi realizado para simular situações de campo, onde as abelhas ingerem alimentos contaminados com GLY e

precisam voar de em busca de novas fontes de alimentos, ou para a colônia, além da capacidade de se deslocar verticalmente.

#### 6.2.5 Histologia do intestino médio

A metodologia utilizada neste bioensaio foi adaptada de Libardoni et al. (2021). Cinco abelhas sobreviventes do bioensaio de exposição crônica (via oral), de cada tratamento, foram utilizadas para análise histológica do intestino médio. Para isso, as abelhas foram anestesiadas em congelador (- 4 ° C) por 1 min, e o intestino médio foi retirado utilizando uma pinça e fixado em solução de *Boiun* por 3 h. As amostras foram então lavadas três vezes em álcool 70% e armazenadas em geladeira a 4 ° C até o processamento.

Para tal, as amostras foram desidratadas por imersão em soluções alcoólicas de diferentes concentrações utilizando a metodologia adaptada de Potrich et al. (2018). Posteriormente, as amostras foram depuradas por imersão em xilol e incluídas em parafina histológica (parafina histológica / cera de abelha, 4:1). O material incorporado foi cortado em espessura de 5 µm usando um micrótomo rotativo manual e montado em lâmina de vidro contendo solução de albumina.

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Primeiramente os cortes foram desparafinizados, reidratados e lavados em água corrente. Em seguida, os cortes foram corados em hematoxilina (40 s) e eosina (10 s) e as lâminas preparadas foram cobertas com lamínulas microscópicas de vidro e fixadas com bálsamo Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram marcadas e analisadas, por teste cego, em microscópio biológico de luz biocular (Zeiss Primo Star), que contém uma câmera digital para captura de imagens e medidas do comprimento das vilosidades. Quinze medidas de cada tratamento foram utilizadas para comparação das médias. Foi realizada avaliação quantitativa, por meio da medida da altura das células ventriculares das abelhas, e avaliação qualitativa, por meio da observação de alterações teciduais.

#### 6.2.6 Análise estatística

Para os dados de sobrevivência das abelhas nos bioensaios de exposição aguda ou crônica (oral ou tópico), utilizou-se a estimativa não paramétrica de Kaplan-

Meier (Kaplan e Meier, 1958). As estimativas K – M dos tratamentos foram comparadas usando um teste de log-rank de pares e toda a análise foi realizada usando o pacote de sobrevivência (Therneau, 2020) do software R.

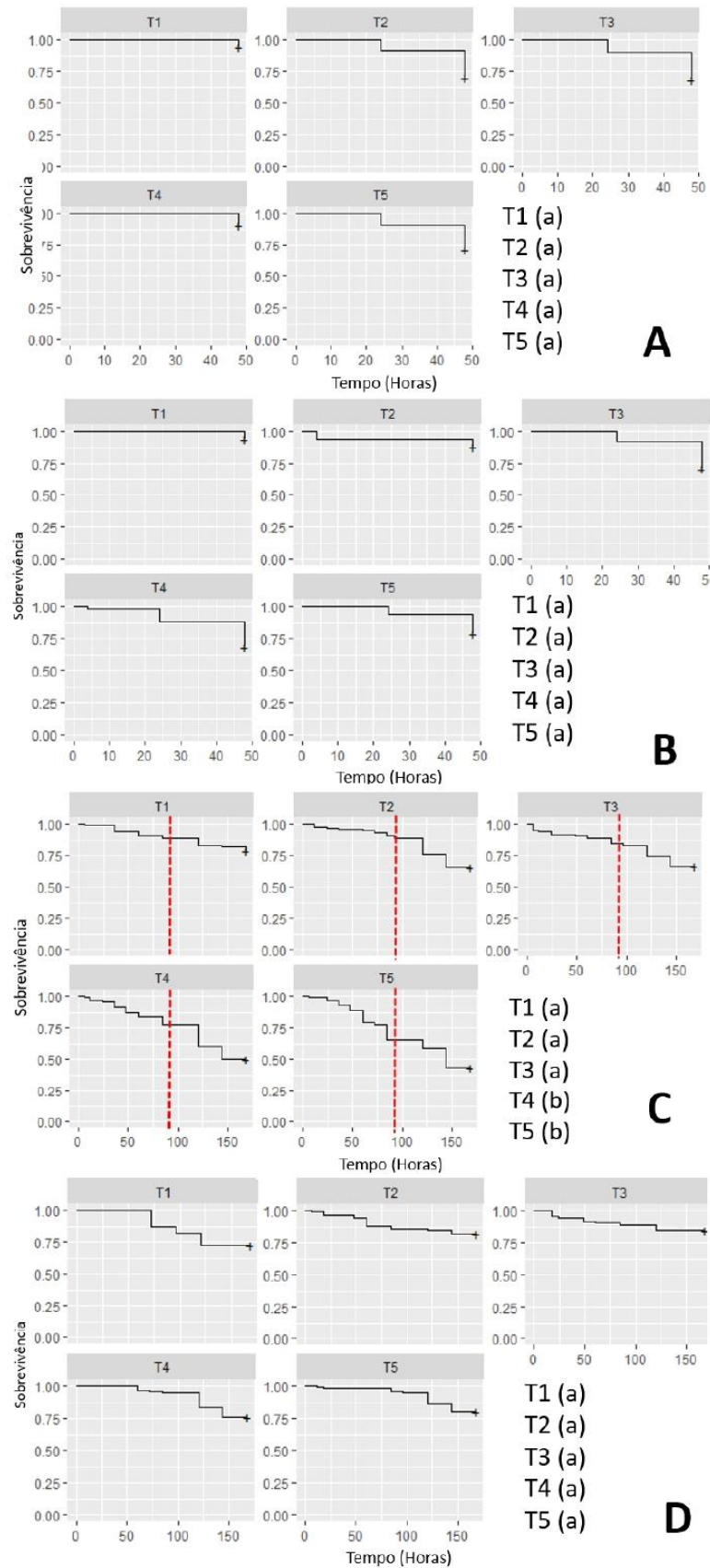
Para os dados dos bioensaios de deslocamento vertical e retomada de voo, modelos de link cumulativo linear generalizado foram usados (Agresti, 2002). Após o ajuste do processo e verificação do modelo procedeu-se com análise post-hoc utilizando o teste de Wald seguido do teste de comparação múltipla de Turkey a 5% de significância. Essas análises foram realizadas usando os seguintes pacotes R: ordinal (Christensen, 2019) e emmeans (Russell, 2020).

Os dados dos bioensaios de locomoção e comprimento das vilosidades são variáveis numéricas quantitativas contínuas. Assim, utilizou-se uma ANOVA unilateral seguida pelo teste de comparação múltipla da Turquia em nível de significância de 5%. A análise foi feita por meio do pacote base do software R.

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Bioensaio de sobrevivência (exposição aguda e crônica)

A exposição aguda ao RT, por via oral e tópica, e a exposição crônica por pulverização, não comprometeram a sobrevivência das abelhas (Figura 1, A, B ,D). No entanto, a exposição crônica ao RT, por via oral, afetou a taxa de sobrevivência das abelhas nos tratamentos T4 (48%) e T5 (42%) em comparação o grupo controle (76%) (Figura 1, C).



**Figura 1.** Porcentagem de sobrevivência de operárias campeiras de *A. mellifera* africanizada, com base no estimador de Kaplan – Meier, ajustado ao período (h). (A)

Exposição aguda por via oral; (B) Exposição aguda por via tópica; (C) Exposição crônica por via oral (linha tracejada indica as 96 h de exposição); (D) Exposição crônica por pulverização; As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os resultados ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada.

### 6.3.2 Bioensaio de Locomoção (deslocamento caminhando)

Após 48 h, apenas as abelhas alimentadas com a dose recomendada (T5 - 100%) tiveram uma redução na distância percorrida, tempo de caminhada e aumentou o tempo de descanso, mas não alterou a velocidade média (Tabela 3 e Apêndice C). A exposição aos demais tratamentos (T2, T3 e T4) não afetou nenhuma variável avaliada (Tabela 3).

**Tabela 3:** Velocidade média das abelhas (mm/s), distância percorrida (mm), tempo (s) de caminhada e tempo (s) de descanso após a ingestão do GLY [ $\pm$  erro padrão (SE)]. Os tratamentos foram T1 - Controle; T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% – dose recomendada (Tabela 1).

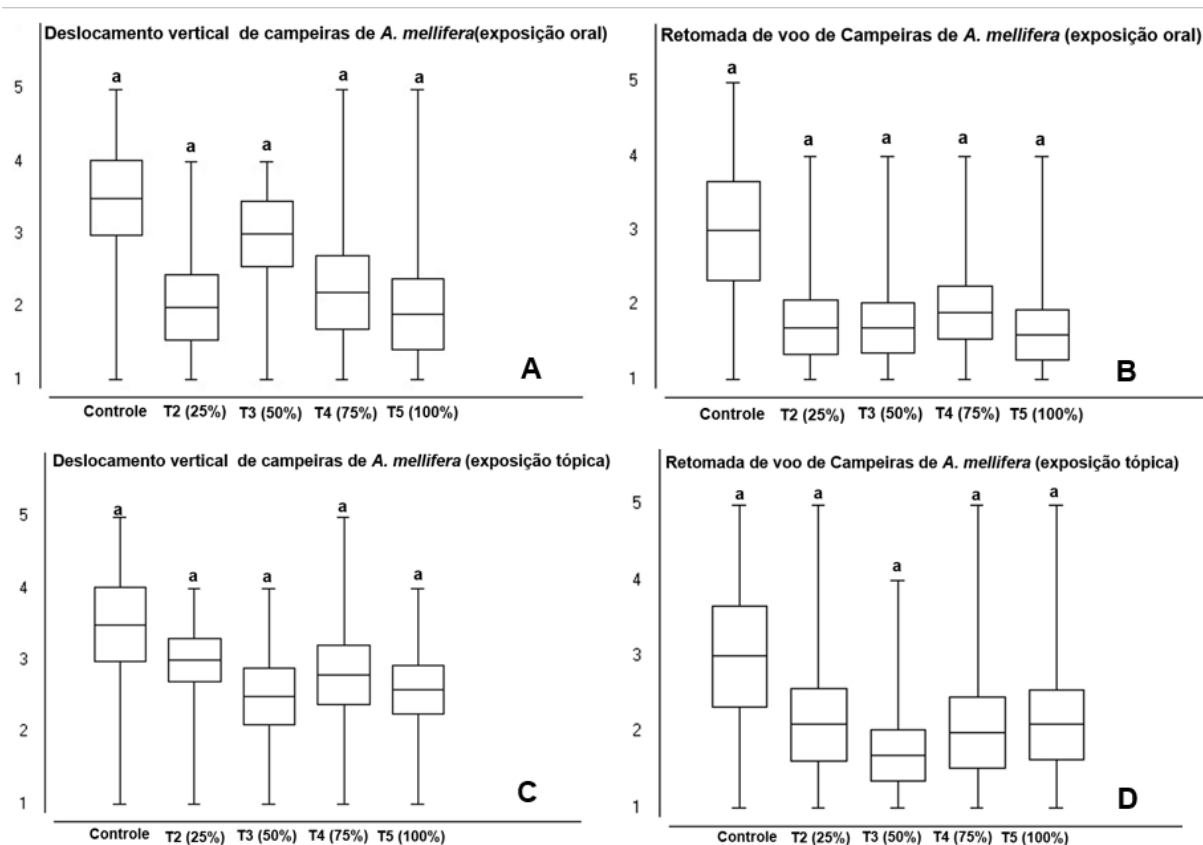
Tratamentos	Velocidade Média (mm/s) $\pm$ SE	Distância Percorrida (mm)	Tempo de Descanso (m <sup>**</sup> )	Tempo de Locomoção (m <sup>**</sup> )
T1	0,38 $\pm$ 0,06 a	195,24 $\pm$ 28,31 a	8,96 $\pm$ 0,21 a	1,04 $\pm$ 0,21 a
T2	0,17 $\pm$ 0,04 a	78,23 $\pm$ 37,87 ab	6,77 $\pm$ 2,50 ab	3,23 $\pm$ 2,50 ab
T3	0,28 $\pm$ 0,01 a	106,38 $\pm$ 18,31 ab	6,47 $\pm$ 1,19 ab	3,53 $\pm$ 1,19 ab
T4	0,37 $\pm$ 0,07 a	108,4 $\pm$ 27,66 ab	4,78 $\pm$ 1,07 ab	5,22 $\pm$ 1,07 ab
T5*	0,28 $\pm$ 0,17 a	60,97 $\pm$ 31,01 b	2,42 $\pm$ 0,32 b	7,58 $\pm$ 0,32 b

\*Dose recomendada pelo fabricante

\*\*Minutos

### 6.3.3 Bioensaio de deslocamento vertical e retomada de voo

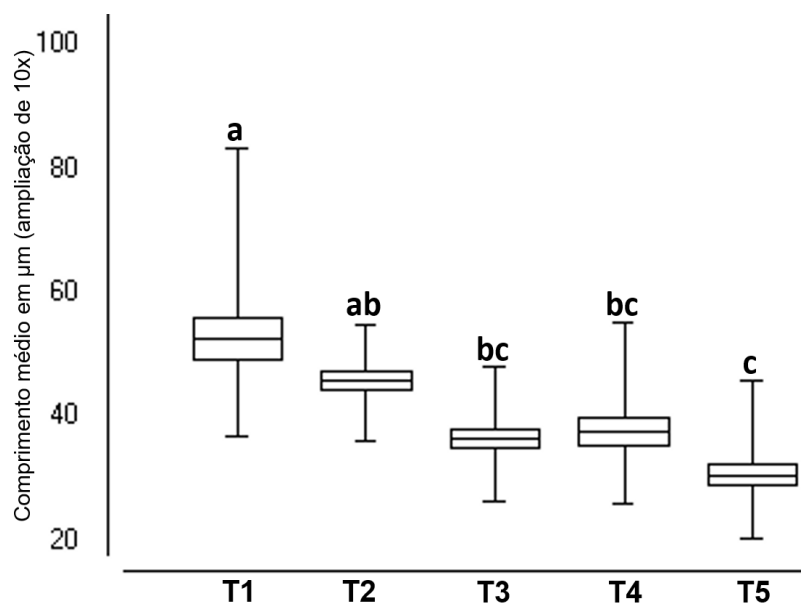
Após 48 h de experimento (bioensaio de exposição aguda), o deslocamento vertical e a retomada de voo não foram afetados pela exposição das abelhas ao RT, por via oral ou tópica, em nenhum tratamento (Figura 3, A, B, C e D).



**Figura 2:** Deslocamento vertical e retomada de voo de operárias campeiras de *A. mellifera* (africanizada), expostas ao RT, por via oral (A e B) e por via tópica (C e D), após 48 h de experimento. Os quadrados representam os valores medianos dos estratos para cada tratamento com os respectivos primeiro e terceiro quartis. As mesmas letras (minúsculas) dentro das figuras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) para o teste de comparação de múltiplos de Tukey. Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada.

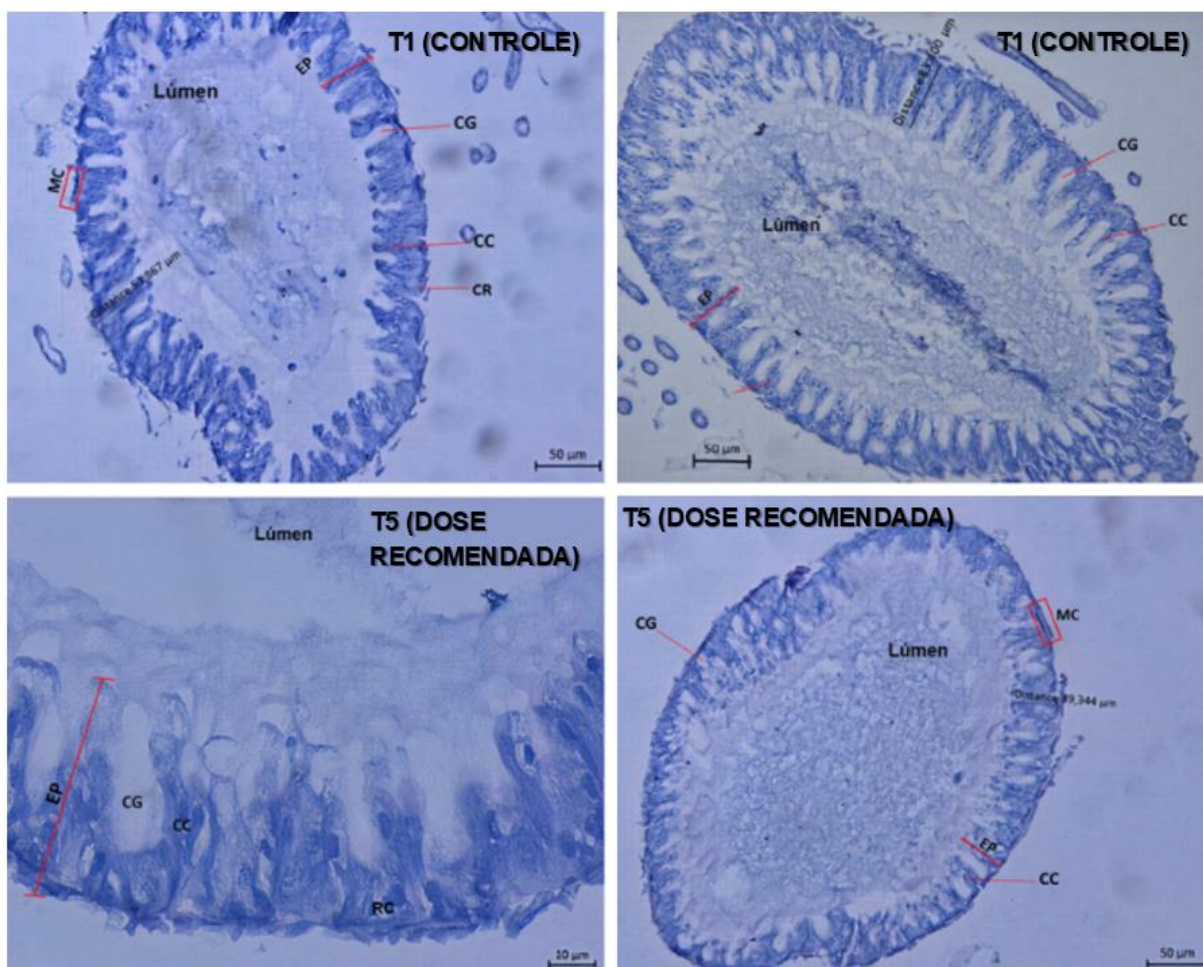
#### 6.3.4 Histologia do intestino médio

A exposição crônica de abelhas ao RT (T3, T4 e T5), por via oral, afetou negativamente a altura das células ventriculares do epitélio (intestino médio) das operárias. Já o T2 não diferiu do grupo controle. A média das alturas do epitélio intestinal foram 52,7649  $\mu\text{m}$  (T1 - controle), 45,7747  $\mu\text{m}$  (T2), 37,9424  $\mu\text{m}$  (T3), 37,6814 (T4) e 30,6295  $\mu\text{m}$  (T5 – dose recomendada) (Figura 3).



**Figura 3:** Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) ( $\pm$  SE) do epitélio do intestino médio de campeiras de *Apis mellifera* africanizadas após exposição crônica, por via alimentar, ao RT. Os tratamentos foram T1 – Controle (água); T2 – 25%; T3 – 50%; T4 – 75%; T5 – 100% da dose recomendada. As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos para o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fotomicrografias intestinais (intestino médio) de *A. mellifera*, do grupo controle e do T5, após o contato crônico com alimento contaminado com RT, estão sendo apresentadas na figura 4. Identificou-se alguns tipos celulares no epitélio do intestino médio (EP), como a célula globulares (CG), regenerativa (CR), colunares ou enterócitos (CC) e músculo circular (MC) (Figura 4).



**Figura 4:** Fotomicrografia do epitélio intestinal (intestino médio) de *A. mellifera* africanizada do grupo controle e após exposição crônica (144 h) ao RT por via oral. EP – Epitélio do Intestino médio; CG – Célula Globular (Caliciforme); CC – Célula Colunar ou enterócito; CR – Célula Regenerativa; MC –Músculo Circular.

Fonte: Autor

#### 6.4 DISCUSSÃO

Verificou-se que o RT afetou a sobrevivência das abelhas africanizadas quando expostas de forma crônica, por via oral, em concentração recomendada pelo fabricante. Já a exposição crônica por pulverização e a exposição aguda, por via oral e tópica, não afetaram a sobrevivência. Uma explicação plausível para estes resultados, é que a exposição crônica oral ao GLY tende a ser danosa, para *A. mellifera* africanizada, quando comparada a exposição tópica em condições de laboratório. A contaminação oral é considerada a principal forma de contágio das abelhas pelos agrotóxicos (Sanchez-Bayo e Goka, 2016). Além disso, sabe-se que o

GLY tem potencial de reduzir a diversidade da microbiota intestinal de *A. mellifera* quando expostas por via oral (Motta et al., 2020, 2018; Motta e Moran, 2020). Estes microrganismos assumem um papel importante nas respostas imunológicas contra patógenos e agrotóxicos, visto que o número de genes relacionados ao metabolismo de desintoxicação de xenobióticos é menor nas abelhas do que em outros insetos (Chmiel et al., 2020). Assim, no presente estudo, é provável que uma exposição alimentar das abelhas ao RT por um período mais longo, tenha debilitado acentuadamente a microbiota intestinal das operárias expostas e refletido na menor sobrevivência destas.

O uso excessivo do GLY formulado nos agroecossistemas tem possibilitado o acúmulo deste herbicida, seus metabólitos e surfactantes, nos ecossistemas o que pode deixar as abelhas mais expostas (Battisti et al., 2021; Brovini et al., 2021; De Andréa et al., 2003; Ledoux et al., 2020; Nagy et al., 2020; Richmond, 2018). Resultado semelhante foi observado para *A. mellifera* (não africanizada), quando a exposição crônica (336 h) afetou a sobrevivência de operárias adultas alimentadas com Roundup (93614 mg/L) (Zhu et al., 2017b). Além disso, o presente estudo também evidencia que, em concentrações subletais, o formulado RT do herbicida GLY pode causar danos estruturais na altura do epitélio do intestino médio de *A. mellifera* africanizada, após exposição crônica por via oral. Utilizou-se este biomarcador pois o intestino é um órgão de extrema importância nos estudos de toxicologia, o qual representa o local de maior interação entre a abelha e o meio externo, igual em outros metazoários (Lee et al., 2017; Malaspina e Silva-Zacarin, 2006).

O intestino médio (ventrículo) das abelhas é formado por um epitélio uniestratificado e por músculos viscerais (longitudinais e circulares) (Lee et al., 2017). O epitélio é constituído por quatro tipos celulares: dois são células prismáticas, com microvilosidades voltadas para o lúmen intestinal. As células prismáticas caliciformes são responsáveis por produzir a membrana peritrófica, localizadas na região anterior ao redor da válvula estomodeal, e as outras, são as células prismáticas digestivas ou enterócitos, responsáveis por secretar enzimas digestivas. Os outros dois tipos são células basais, regenerativas e as endócrinas, que se localizam de forma isolada (Carmina, 2009; Forkpah et al., 2014; Snodgrass, 1956).

O intestino médio das abelhas é responsável pela digestão dos nutrientes e pela maior parte da absorção (Carmina, 2009; Lee et al., 2017). Assim, uma diminuição na altura epitelial pode causar um efeito negativo nutricional nas abelhas

(Burt e Wigglesworth, 1966; Cruz-Landim, 2009), o pode causar redução na absorção dos nutrientes. Além da digestão e absorção, o intestino médio das abelhas é essencial para defesa imunológica e desintoxicação (Kurze et al., 2018). Para manter essas funções, as células danificadas são constantemente substituídas através de divisões celulares e por apoptose. Estes processos são fundamentais para a homeostase intestinal, por isso, a regulação da taxa de proliferação e diferenciação celular é crucial para a integridade estrutural e funcional do epitélio intestinal (Lee et al., 2017).

Gregorc e Ellis (2011) observaram que a exposição crônica de larvas de *A. mellifera* ao GLY, pela alimentação, causou fragmentação do DNA e a ocorrência acelerada de apoptose em células do intestino médio. Os autores enfatizam que isso pode ser um mecanismo de defesa em larvas, mas mesmo em concentrações toleráveis, eventos como necrose, danos teciduais no intestino e até mesmo a mortalidade larval, são eventos possíveis de ocorrer. Além do mais, a exposição oral crônica pode causar peroxidação lipídica, gerar estresse oxidativo (Helmer et al., 2015; Jumarie et al., 2017) e causar alterações no funcionamento de genes importantes ao processo digestivo (Zhao et al., 2020). Assim, uma hipótese plausível, é a de que os eventos citados acima poderiam estar relacionados aos danos observados na altura do epitélio intestinal das abelhas africanizadas após a exposição crônica ao RT.

Foi observado que a exposição aguda via oral afetou a capacidade de caminhada de campeiras de *A. mellifera* africanizada, mas não o deslocamento vertical e a retomada do voo. Considerando-se, que a capacidade de deslocamento usando as pernas é essencial dentro e fora da colmeia, espera-se um efeito negativo o na atividade das campeiras em realizar suas funções. Por exemplo, comprometer a capacidade de caminhada das campeiras pode reduzir a atividade de forrageamento no campo (Lopes et al., 2017; Yang et al., 2008) e, conseqüentemente, diminuir a capacidade de conseguir recursos alimentares, além de prejudicar o serviço de polinização. Além do mais, estudos tem mostrado que o GLY e seus formulados pode afetar a capacidade de escalada (Luo et al., 2021) e a capacidade de voo (Abraham et al., 2018; Balbuena et al., 2015) de *A. mellifera* não africanizada. Comparando-se aos resultados do presente estudo, duas hipóteses plausíveis poderiam explicar a diferença observada, considerando os resultados com abelhas africanizadas e não africanizadas: (1) Diferenças inerentes da abelhas africanizadas, a qual se tem

mostrado mais resistentes comparadas as raças europeias (Calderone, 2012; Calfee et al., 2020; Guzman-Novoa et al., 2020); (2) Possível efeito menos danoso do RT ainda não testado em raças europeias.

Observou-se também que a exposição tópica (aguda) do GLY à campeiras de *A. mellifera* africanizada não afetou o deslocamento vertical e retomada de voo. No entanto, devemos considerar que a absorção do produto, quando aplicado por via tópica, é mais rápida em comparação a via alimentar. Por isso, a tendência é que a exposição por via tópica aos agrotóxicos, neste caso ao GLY, leve as abelhas a desencadearem efeitos subletais nas primeiras 24 h, pois nas 48 h o GLY pode ter sido metabolizado. Nessa perspectiva, novos estudos que avaliem os efeitos da exposição tópica, com 24h de experimento, do GLY em *A. mellifera* africanizada no deslocamento vertical e retomada de voo são interessantes para a compreensão do real efeito.

As abelhas podem ter alterações comportamentais severas se forragearem néctar e pólen contaminados com Roundup (Luo et al., 2021). Sabe-se que a degradação do GLY (e metabólitos) no ambiente é lenta, podendo variar entre dias a alguns meses (Giesy et al., 2000; Gill et al., 2018). Além disso, dependendo da matriz, podem persistir por mais tempo do que se imaginava no ambiente, isto porque a aplicação de produtos à base de glifosato tornou-se prática comum, possibilitando o acúmulo deste herbicida, ou de seus metabólitos, nos ecossistemas (Battisti et al., 2021; Brovini et al., 2021; De Andréa et al., 2003; Ledoux et al., 2020; Marques et al., 2021; Richmond, 2018). Além do mais, a seleção de plantas invasoras resistentes ao GLY, agricultores costumam aplicar doses elevadas, até mesmo dobrar a concentração deste produto, para enfrentar este problema (Abraham et al., 2018). Isso faz com que as abelhas sejam expostas a altas concentrações quando entram em contato com a planta, pólen ou néctar durante (ou após) a pulverização (Abraham et al., 2018; Battisti et al., 2021; Thompson et al., 2014; Zhu et al., 2015). Além do mais, produtos formulados a base de GLY também podem ser prejudiciais a outros invertebrados e vertebrados (Ghisi et al., 2016; Gill et al., 2018), causar doenças em seres humanos quando usados a longo prazo (Benachour e Séralini, 2009; Luo et al., 2021; Mesnage et al., 2012; Nagy et al., 2020), o que torna o assunto sempre atual e relevante.

Neste contexto, os resultados obtidos são importantes por contribuírem com novas informações na literatura sobre um formulado de GLY amplamente utilizado no

Brasil e por auxiliar no entendimento da toxicidade de produtos formulados a base de GLY sobre as abelhas. Estes resultados reforçam ainda a necessidade de mais trabalhos nesta área, visto a importância das abelhas para os ecossistemas, e pelo fato do GLY ser o princípio ativo mais vendido no mundo. Testes realizados em condições de laboratório, são de extrema importância para entender o real efeito do RT sobre as abelhas africanizadas, mas é importante que estudos complementares também sejam realizados para um entendimento do efeito deste produto no desenvolvimento da colônia, na produção da rainha e das crias.

## 6.5 CONCLUSÃO

A exposição crônica por via oral, de *A. mellifera* africanizada ao RT, reduz a sobrevivência na concentração recomendada pelo fabricante. Além de causar danos na espessura do epitélio intestinal (intestino médio) em condições de laboratório, na dose recomendada e diluições 50% e 75%. Já a exposição aguda por via oral pode afetar a capacidade de caminhada em condições de laboratório na dose recomendada. O RT não afetou o deslocamento vertical e retomada de voo.

## 6.6 REFERÊNCIAS

- Abastecimento, A.-M. da C.A. e, 2020. Secretaria de Defesa Agropecuária Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos. Relatório de ingredientes ativos [WWW Document]. URL [http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit\\_cons&ingredientes\\_ativos.rdf&p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=&p\\_nm\\_comum\\_port=glifosato&p\\_id\\_grupo\\_quimico=&p\\_id\\_classe=&p\\_id\\_cultura=&p\\_tipo\\_relatorio=DETALHADO&paramform=no](http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit_cons&ingredientes_ativos.rdf&p_id_ingrediente_ativo=&p_nm_comum_port=glifosato&p_id_grupo_quimico=&p_id_classe=&p_id_cultura=&p_tipo_relatorio=DETALHADO&paramform=no) (acessado 3.26.20).
- Abati, R., Sampaio, A.R., Mendes, R., Maciel, A., Colombo, F.C., Libardoni, G., Battisti, L., Lozano, E.R., Ghisi, N.D.C., Costa-maia, F.M., Potrich, M., 2021. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>
- Abou-Shaara, H.F., Abuzeid, M.A., 2018. Effects of two herbicides on healthy and Nosema infected honey bee workers. *Arthropods* 7, 31–41.
- Abraham, J., Benhotons, G.S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., Abraham, J.D.,

2018. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 166, 695–702. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- ADAPAR - Agência de defesa agropecuária do Paraná, 2021. Agrotóxicos no Paraná. Agrotóxicos liberados para uso no estado. [WWW Document]. URL <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/listar.asp?Cod=1639&descIngrediente=&CodIngredienteAtivo=null&CodFormulacao=null&IdRegistrante=null&CodFormaAcao=null&CodAlvo=null&CodGrupoQuimico=null&CodClassToxicologica=null&CodSituacao=null&CodClassificacao=n>
- Agresti, A., 2002. *Categorical Data Analysis*. Wiley, New York.
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021a. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. [WWW Document]. 2021. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- AGROFIT - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021b. Relatórios de Produtos Formulados [WWW Document]. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M., 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.* 103, 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Allen-wardell, A.G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Cox, P.A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., Inouye, D., Jones, C.E., Kennedy, K., Kevan, P., Medellín, R., Medellín-morales, S., Nabhan, G.P., Pavlik, B., Tepedino, V., Torchio, P., Walker, S., 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields 12, 8–17.
- Alves, G.S., Cunha, J.P.A.R. da, 2014. Field data and prediction models of pesticide spray drift on coffee crop. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 49, 622–629. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800006>
- Amarante Junior, O.P., Dos Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova* 25, 589–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400014>
- Araújo, R. dos S., Bernardes, R.C., Martins, G.F., 2021. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. *Sci. Total Environ.* 763, 142980.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142980>
- Bacaxixi, P., Bueno, C.E.M.S., Ricardo, H.A., Epiphanio, P.D., Silva, D.P., Barros, B.M.C., Silva, T.F., Bosquê, G.G., Lima, F.C.C., 2011. a Importância Da Apicultura No Brasil. *Rev. Científica Eletrônica Agron.* 5.
- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 462–470. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>
- Balbuena, M.S., Tison, L., Hahn, M.L., Greggers, U., Menzel, R., Farina, W.M., 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* 218, 2799–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>
- Baptista, A.P.M., Carvalho, G.A., Carvalho, S.M., Carvalho, C.F., Bueno Filho, J.S. de S., 2009. Toxicity of pesticides used in citrus crop to *Apis mellifera*. *Cienc. Rural* 39, 955–961. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000049>
- Barbosa, D.B., Crupinski, E.F., Silveira, R.N., Limberger, D.C.H., 2017. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 3, 694–703. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Batra, S.W.T., 1984. Solitary bees. *Sci. Am.* 250, 120–127.
- Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A.R., de Castilhos Ghisi, N., Costa-Maia, F.M., Abati, R., dos Reis Martinez, C.B., Sofia, S.H., 2021. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Sci. Total Environ.* 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>
- Belsky, J., Joshi, N.K., 2020. Effects of Fungicide and Herbicide Chemical Exposure on *Apis* and Non-*Apis* Bees in Agricultural Landscape. *Front. Environ. Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>
- Benachour, N., Séralini, G.E., 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 97–105. <https://doi.org/10.1021/tx800218n>
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benzie, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences,

- measurement and dietary influences. *Food Sci. Nutr.* 47, 233–261.
- Beringer, J., 2019. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Rev. Eletrônica Científica da UERGS* 5, 18–27. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>
- Beyaert, L., Greggers, U., Menzel, R., 2012. Honeybees consolidate navigation memory during Sleep. *J. Exp. Biol.* 215, 3981–3988. <https://doi.org/10.1242/jeb.075499>
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (80-. ). 313, 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Blacquièrè, T., van der Steen, J.J.M., 2017. Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Manag. Sci.* 73, 1299–1304. <https://doi.org/10.1002/ps.4583>
- Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., Delatte, H., 2019. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., Chagnon, M., 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>
- Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.
- Bovi, T.S., Zaluski, R., Orsi, R. de O., 2018. Toxicity and motor changes in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 239–245. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820150191>
- Brovini, E.M., de Deus, B.C.T., Vilas-Boas, J.A., Quadra, G.R., Carvalho, L., Mendonça, R.F., Pereira, R. de O., Cardoso, S.J., 2021. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Sci. Total Environ.* 771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>
- Brühl, C.A., Zaller, J.G., 2019. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. *Front. Environ. Sci.* 7, 2013–2016. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>

- Burt, E.T., Wigglesworth, V.B., 1966. The principles of insect physiology, *The Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.2307/2496>
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Calderón, R.A., van Veen, J.W., Sommeijer, M.J., Sanchez, L.A., 2010. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 50, 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9325-4>
- Calderone, N.W., 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS One* 7, 24–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>
- Calfee, E., Agra, M.N., Palacio, M.A., Ramírez, S.R., Coop, G., 2020. Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas, *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009038>
- Canciani, M., Arnellos, A., Moreno, A., 2019. Revising the superorganism: An organizational approach to complex eusociality. *Front. Psychol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02653>
- Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E., 2020. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189, 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
- Carraschi, S.P., Cubo, P., Schiavetti, B.L., Shiogiri, N.S., da Cruz, C., Pitelli, R.A., 2011. Toxic effects of phytosanitary surfactants for jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Sci. - Biol. Sci.* 33, 191–196. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v33i2.6252>
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Chaves, A., Faita, M.R., Ferreira, B.L., Poltronieri, A.S., Nodari, R.O., 2020. Effects of glyphosate-based herbicide on royal jelly production of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in field conditions. *J. Apic. Res.* 60, 277–279. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844463>
- Chiari, W.C., de Toledo, V. de A.A., Hoffmann-Campo, C.B., Ruvolo-Takasusuki,

- M.C.C., de Toledo, T.C.S. de O.A., Lopes, T. da S., 2008. Polinização por apis mellifera em soja transgênica [Glycine max (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. *Acta Sci. - Agron.* 30, 267–271.
- Chiari, W.C., De Toledo, V.D.A.A., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Braz De Oliveira, A.J., Sakaguti, E.S., Attencia, V.M., Costa, F.M., Mitsui, M.H., 2005. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 31–36. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000100005>
- Chmiel, J.A., Daisley, B.A., Pitek, A.P., Thompson, G.J., Reid, G., 2020. Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: A role for probiotics as mediators of environmental stress. *Front. Ecol. Evol.* 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00022>
- Christensen, R.H.B., 2019. Ordinal-Regression Models for Ordinal Data. R package version 2019. [WWW Document]. URL <https://cran.r-project.org/package=ordina>
- Classen, A., Peters, M.K., Ferger, S.W., Helbig-Bonitz, M., Schmack, J.M., Maassen, G., Schleuning, M., Kalko, E.K.V., Böhning-Gaese, K., Steffan-Dewenter, I., 2014. Complementary ecosystem services provided by pest predators and pollinators increase quantity and quality of coffee yields. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3148>
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x>
- Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB), 2020. Acompanhamento da Safra Brasileira - CAFÉ Quarto levantamento | DEZEMBRO 2020. *Obs. Agrícola* 5, 1–45.
- CONAB, 2019. Acompanhamento da safra brasileira de café. Quarto Levant. 5, 1–44.
- CONAB, 2017. A Cultura do Café: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2008 a 2017. *Camp. Nac. Abast.* 12, 54.
- Conagin, C.H.T.M., Mendes, A.J.T., 1961. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. *Pesqui. Citológicas e Genéticas* 20, 18.
- Cruz-Landim, C. da., 2009. Abelhas: Morfologia e função dos sistemas, UNESP. ed. São Paulo.
- Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2002.

- The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* 17, 491. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(02\)02600-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(02)02600-9)
- D'Avila, M., Marchini, L.C., 2005. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. *B. Industr. anim.* 62, 79–90.
- Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Wu, Y., Liu, Y., Diao, Q., 2018. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7786–7793. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212>
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., Neumann, P., 2012. Colony collapse disorder in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
- De Andréa, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M.B., Tedeschi Savoy, V.L., 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 38, 1329–1335. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001100012>
- Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I., 2020. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Dick, R.E., Quinn, J.P., 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 545–550. <https://doi.org/10.1007/BF00218464>
- Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D., Hauptfear, E.A., 2010. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties, in: *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. p. 344.
- Doner, L.W., 1977. The sugars of honey—A review. *J. Sci. Food Agric.* 28, 443–456. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>
- El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M.L., de Graaf, D.C., Saegerman, C., 2020. Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-

- based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Sci. Total Environ.* 704, 135312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135312>
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and colony collapse disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134–136. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Fagard, R.H., Staessen, J.A., LutgardeThijs, 1996. Advantages and disadvantages of the meta-analysis approach. *J. Hypertens.* 14, 9–13. <https://doi.org/10.1097/00004872-199609002-00004>
- Faghani, M., Rahimian, Y., 2018. Effect of glyphosate on honey bee (*Apis Mellifera*) performance 7, 77–81.
- Faita, M.R., Cardozo, M.M., Amandio, D.T.T., Orth, A.I., Nodari, R.O., 2020. Glyphosate-based herbicides and *Nosema* sp. microsporidia reduce honey bee (*Apis mellifera* L.) survivability under laboratory conditions. *J. Apic. Res.* 59, 332–342. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1736782>
- Faita, M.R., Oliveira, E. de M., Alves, V.V., Orth, A.I., Nodari, R.O., 2018. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere* 211, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.189>
- Farah, A., Santos, T.F. dos, 2015. The Coffee Plant and Beans: An Introduction, in: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., p. 5–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>
- Fathi, M.A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., Li, C., 2020. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 16865–16875. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08269-3>
- Ferrão, R., Fonseca, A.F., Ferrão, M.A.G., Muner, L., 2017. *Café Conilon*, 2º. ed. Vitória, ES. INCAPER.
- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Filho, D.B.S., Paranhos, R., Júnior, J.A.S., Rocha, E.C., Alves, D.F., 2014. O que é,

- para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teor. e Pesqui.* 23, 205–228. <https://doi.org/10.4322/tp.2014.018>
- Forkpah, C., Dixon, L.R., Fahrbach, S.E., Rueppell, O., 2014. Xenobiotic effects on intestinal stem cell proliferation in adult honey bee (*Apis mellifera* L) workers. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091180>
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Garibaldi, L.A., Steffan-dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., 2014. Honey Bee Abundance. *Science* (80-. ). 339, 1608–1611.
- Ghisi, N. de C., Oliveira, E.C. de, Prioli, A.J., 2016. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* 145, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>
- Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M., 2015a. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46, 209–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Giannini, T.C., Cordeiro, G.D., Freitas, B.M., Saraiva, A.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2015b. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108, 849–857. <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2)
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Glass, G. V., 1976. Primary , Secondary , 5, 3–8.
- Gomes, I.N., Ingrid Castelan Vieira, K., Moreira Gontijo, L., Canto Resende, H., 2020. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. *Ecotoxicology* 29, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>

- Gonalons, C.M., Farina, W.M., 2018. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.176644>
- Gong, Y., Diao, Q., 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 0–1. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., 2012. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.* 142, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-. ). 347. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Graffigna, S., Marrero, H.J., Torretta, J.P., 2020. Glyphosate commercial formulation negatively affects the reproductive success of solitary wild bees in a Pampean agroecosystem. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00816-8>
- Gregorc, A., Ellis, J., 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol* 99, 200–207.
- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M., Maleszka, R., Belzunces, L.P., 2001. Contrasting effects of Imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 76, 183–191. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3995>
- Guzman-Novoa, E., Morfin, N., De la Mora, A., Macías-Macías, J.O., Tapia-González, J.M., Contreras-Escareño, F., Medina-Flores, C.A., Correa-Benítez, A., Quezada-Euán, J.J.G., 2020. The Process and Outcome of the Africanization of Honey Bees in Mexico: Lessons and Future Directions. *Front. Ecol. Evol.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.608091>
- Han, F., Wallberg, A., Webster, M.T., 2012. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecol. Evol.* 2, 1949–1957. <https://doi.org/10.1002/ece3.312>
- Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2015. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>

- Herbert, L.T., Vázquez, D.E., Arenas, A., Farina, W.M., 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217, 3457–3464. <https://doi.org/10.1242/jeb.109520>
- Hernández, J., Riveros, A.J., Amaya-Márquez, M., 2021. Sublethal doses of glyphosate impair olfactory memory retention, but not learning in the honey bee (*Apis mellifera scutellata*). *J. Insect Conserv.* 25, 683–694. <https://doi.org/10.1007/s10841-021-00335-6>
- Hung, K.L.J., Kingston, J.M., Albrecht, M., Holway, D.A., Kohn, J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Hyne, R. V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 366–374. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00119-7)
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2017. Some organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis, 2020. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2020. [WWW Document]. 2020. URL <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>
- IBAMA - Ministério do meio ambiente, 2020. Relatórios de comercialização de agrotóxicos [WWW Document]. URL <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA., 2020. Pesquisa pecuária municipal [WWW Document]. URL <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019> (acessado 9.27.21).
- Imperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D. de A., Saraiva, A.M., 2012. Polinizadores e Polinização – um Tema Global, in: *Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo, p. 489.
- IPBES, 2016. *Pollination and, Science*.
- Israili, Z.H., 2014. Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* 21, 304–323. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b>

- Johnson, R., 2013. Honey bee colony collapse disorder. *Honey Bees Colony Collapse Disord. Sel. Anal.* 69–92.
- Johnson, R.M., 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>
- Jong, D. De, 1996. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World* 77, 67–70. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099289>
- Jumarie, C., Aras, P., Boily, M., 2017. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere* 168, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete samples. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M., 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83>
- Kirkwood, R.C., Hetherington, R., Reynolds, T.L., Marshall, G., 2000. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): Influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest Manag. Sci.* 56, 359–367. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S)
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A.B., Lihoreau, M., 2017. Why bees are so vulnerable to environmental stressors 32, 268–278.
- Kluser, S., Peduzzi, P., 2007. Global pollinator decline : A literature review. *Conserv. Ecol.* 1–10.
- Krimsky, S., 2021. Can glyphosate-based herbicides contribute to sustainable agriculture? *Sustain.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.3390/su13042337>
- Kwong, W.K., Mancenido, A.L., Moran, N.A., 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci.* 4. <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Kurze, C., Le Conte, Y., Kryger, P., Lewkowski, O., Müller, T., Moritz, R.F.A., 2018. Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *J. Invertebr. Pathol.* 154, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.008>
- Kwong, W.K., Moran, N.A., 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Latini, A.O., Silva, D.P., Souza, F.M.L., Ferreira, M.C., Moura, M.S. de, Suarez, N.F.,

2020. Reconciling coffee productivity and natural vegetation conservation in an agroecosystem landscape in Brazil. *J. Nat. Conserv.* 57. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125902>
- Ledoux, M.L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L., Lee, S.O., 2020. Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control* 109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106859>
- Lee, J.H., Lee, K.A., Lee, W.J., 2017. Microbiota, Gut Physiology, and Insect Immunity, 1<sup>o</sup> ed, P. Ligoxygakis (Ed.) , *Advances in Insect Physiology*, Academic Press, p. 111 - 138 (Capítulo 4).
- Lefebvre, C., Manheimer, E., Glanville, J., 2008. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. <https://doi.org/10.1002/9781119536604>
- Lehmann, D.M., Camp, A.A., 2021. A systematic scoping review of the methodological approaches and effects of pesticide exposure on solitary bees. *PLoS One* 16, e0251197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251197>
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Liao, L.H., Wu, W.Y., Berenbaum, M.R., 2017. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Sci. Rep.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15066-5>
- Libardoni, G., Neves, P.M.O.J., Abati, R., Sampaio, A.R., Costa-Maia, F.M., de Souza Vismara, E., Lozano, E.R., Potrich, M., 2021. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82874-1>
- Lima, M.C. de, Rocha, S. de A., 2012. Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil, IBAMA (Ins. ed. Brasília - DF).
- Lima, É.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciencias Farm. J. Pharm. Sci.* 37, 293–303.
- Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., 2016. Agrochemical-induced stress instingles bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J Comp Physiol A* 202, 1–15.
- Lopes, M.P., Fernandes, K.M., Vaner, H., Tomé, V., 2017. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest Manag. Sci.*

- Lovatto, P.A., Lehnen, C.R., Andretta, I., Carvalho, A.D., Hauschild, L., 2007. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 285–294. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007001000026>
- Luiz, A.J., 2002. Meta-Análise: Definição, Aplicações E Sinergia Com Dados Espaciais. *Cad. Ciência Tecnol.* 19, 407–428.
- Luo, Q.H., Gao, J., Guo, Y., Liu, C., Ma, Y.Z., Zhou, Z.Y., Dai, P.L., Hou, C.S., Wu, Y.Y., Diao, Q.Y., 2021. Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. *Sci. Rep.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80445-4>
- Mackos, A.R., Varaljay, V.A., Maltz, R., Gur, T.L., Bailey, M.T., 2016. Role of the intestinal microbiota in host responses to stressor exposure, 1<sup>o</sup> ed, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.002>
- Maini, S., Medrzycki, P., Porrini, C., 2010. The puzzle of honey bee losses: A brief review. *Bull. Insectology* 63, 153–160.
- Marques, J.G. de C., Veríssimo, K.J. da S., Fernandes, B.S., Ferreira, S.R. de M., Montenegro, S.M.G.L., Motteran, F., 2021. Glyphosate: A Review on the Current Environmental Impacts from a Brazilian Perspective. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 107, 385–397. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03295-4>
- Malaspina, O., Silva-Zacarin, E.C. da, 2006. Cell Markers for Ecotoxicological Studies in Target Organs of Bees. *Brazilian J. Morphol. Sci.* 23, 303–309.
- Mesnage, R., Moesch, C., Grand, R. Le, Lauthier, G., Vendômois, J.S. de G., Séralin, S.G.-E., 2012. Glyphosate Exposure in a Farmer's Family. *Am. J. Hum. Genet.* 3, 1001–1003. <https://doi.org/10.1086/340363>
- Michener, C., 2007. *The Bees of the World*. Baltimore.
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees: a comparative study*, Harvard Un. ed.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>
- Monquero, P.A., Oliveira, A.S., 2018. Os herbicidas causam impactos na sobrevivência e desenvolvimento de abelhas? *Rev. Bras. Herbic.* 1, 95. <https://doi.org/10.7824/rbh.v1i1.533>
- Morais, M.M., Jong, D. De, Message, D., Gonçalves, L.S., 2012. Perspectivas e Desafios para o Uso das Abelhas *Apis mellifera* como Polinizadores no Brasil, in:

- Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo, p. 489.
- Moreno, N.C., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.012>
- Morowati, M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. *Environmentalist* 20, 105–111. <https://doi.org/10.1023/A:1006704009184>
- Motta, E.V.S., Mak, M., De Jong, T.K., Powell, J.E., O'Donnell, A., Suhr, K.J., Riddington, I.M., Moran, N.A., 2020a. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 86. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E.V.S., Mak, M., De Jong, T.K., Powell, J.E., O'Donnell, A., Suhr, K.J., Riddington, I.M., Moran, N.A., 2020b. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E.V.S., Moran, N.A., 2020. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: Effects of intensity, duration, and timing of exposure. *Systems* 5, 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00268-20>
- Motta, E.V.S., Raymann, K., Moran, N.A., 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Murawska, A., Migdał, P., Roman, A., 2021. Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. *Agric.* 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070648>
- Nagy, K., Duca, R.C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P.T.J., Godderis, L., Ádám, B., 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations, *Environmental Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
- Nocelli, R.C.F., Soares, S.M., Monquero, P., 2019. Effects of herbicides on the survival of the brazilian native bee *Melipona scutellaris latreille*, 1811 (hymenoptera: apidae). *Planta Daninha* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1590/S0100->

83582019370100

- Odemer, R., Alkassab, A.T., Bischoff, G., Frommberger, M., Wernecke, A., Wirtz, I.P., Pistorius, J., Odemer, F., 2020. Chronic high glyphosate exposure delays individual worker bee (*Apis mellifera* L.) development under field conditions. *Insects* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects11100664>
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998a. Guidelines for the Testing of Chemicals: Honeybees, acute contact toxicity test 1–13.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998b. Guidelines for the Testing of Chemicals : Honeybees, Acute oral toxicity test 1–44.
- Oliveira, M.L. de, Cunha, J.A., 2005. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepelletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amaz.* 35, 389–394. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672005000300013>
- Olkin, I., 1995. Statistical and theoretical considerations in meta-analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 48, 133–146. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)00136-E](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)00136-E)
- Olkin, L., 1992. Meta-analysis: methods for combining independent studies. *Stat. Sci.* 7.
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Oost, R. Van Der, Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.-D., Ascher, J.S., 2020. Global patterns and drivers of bee distribution. *Curr. Biol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>
- Parker, R., Melathopoulos, A.P., White, R., Pernal, S.F., Guarna, M.M., Foster, L.J., 2010. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011096>
- Pazini, J.B., Pasini, R.A., Rakes, M., de Armas, F.S., Seidel, E.J., da S Martins, J.F., Grützmacher, A.D., 2017. Toxicity of pesticide tank mixtures from rice crops against *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). *Neotrop. Entomol.* 46, 461–470. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0483-5>
- Pérez, L., Solange, M., Mir, L., 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-

- based formulations on aquatic ecosystems. *Herbic. Environ.* <https://doi.org/10.5772/12877>
- Peruzzolo, M.C., Cruz, B.C.F. da, Ronqui, L., 2019. Polinização e produtividade do café no Brasil. *Pubvet* 14, 1–6. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a317.1-6>
- Pignati, W.A., e Lima, F.A.N. de S., de Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.D.C., Pignatti, M.G., 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. *Cienc. e Saude Coletiva* 22, 3281–3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>
- Pinto, M.A., Rubink, W.L., Patton, J.C., Coulson, R.N., Johnston, J.S., 2005. Africanization in the United States: Replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. *Genetics* 170, 1653–1665. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035030>
- Pires, C.S.S., de Mello Pereira, F., do Rêgo Lopes, M.T., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, É.W., 2016. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 422–442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753–2766. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>
- Qiu, S., Fu, H., Zhou, R., Yang, Z., Bai, G., Shi, B., 2020. Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109846. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>
- Quigley, T.P., Amdam, G. V., Harwood, G.H., 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 35, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.08.012>
- Raine, B.N.E., 2018. of Bumblebees Inside the Nest. *Science* (80-. ). 362, 643–645.
- Reilly, J.R., Artz, D.R., Biddinger, D., Bobiwash, K., Boyle, N.K., Brittain, C., Brokaw, J., Campbell, J.W., Daniels, J., Elle, E., Ellis, J.D., Fleischer, S.J., Gibbs, J., Gillespie, R.L., Gundersen, K.B., Gut, L., Hoffman, G., Joshi, N., Lundin, O., Mason, K., McGrady, C.M., Peterson, S.S., Pitts-Singer, T.L., Rao, S., Rothwell, N., Rowe, L., Ward, K.L., Williams, N.M., Wilson, J.K., Isaacs, R., Winfree, R., 2020. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators: Pollination limitation in US crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 2–9.

- <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>
- Richmond, M.E., 2018. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J. Environ. Stud. Sci.* 8, 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>
- Rissoli, R.Z., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Rantin, F.T., McKenzie, D.J., Kalinin, A.L., 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 156, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.083>
- Robertis, E.M., Hib, J., 2017. *Biologia celular e molecular*, 16<sup>o</sup> ed, Rev. Elet. Cient.
- Rolando, C.A., Baillie, B.R., Thompson, D.G., Little, K.M., 2017. The risks associated with glyphosate-based herbicide use in planted forests. *Forests* 8, 1–26. <https://doi.org/10.3390/f8060208>
- Rosanigo, M.P., Marrero, H.J., Torretta, J.P., 2020. Limiting resources on the reproductive success of a cavity-nesting bee species in a grassland agroecosystem. *J. Apic. Res.* 59, 583–591. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1726034>
- Ruiz-Toledo, J., Sánchez-Guillén, D., 2014. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta zoológica Mex.* 30, 408–413.
- Russell, L., 2020. R Package 'emmeans': Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means [WWW Document]. URL <https://github.com/rvlenth/emmeans>
- Ruttner, F., 1992. *Naturgeschichte der Honigbienen*, Ehrenwirth. ed. München.
- Ruttner, F., Tassencourt, L., Louveaux, J., 1978. Biometrical-satistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381.
- Samsel, A., Seneff, S., 2013. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy* 15, 1416–1463. <https://doi.org/10.3390/e15041416>
- Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Saturni, F.T., Jaffé, R., Metzger, J.P., 2016. Landscape structure influences bee community and coffee pollination at different spatial scales. *Agric. Ecosyst.*

- Environ. 235, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.008>
- Schneider, S.S., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, D.R., 2004. The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 351–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123359>
- Seide, V.E., Bernardes, R.C., Pereira, E.J.G., Lima, M.A.P., 2018. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Pollut.* 243, 1854–1860. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar, R.D., Dar, O.I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Silva, G.M., Finley, D., Vogel, C., 2015. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 116–123. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2955>
- Souza, A.P.F., Rodrigues, N.R., Reyes, F.G.R., 2021. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 14, 40–47. <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1855676>
- Snodgrass, R.E. (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates. 334 p.
- Stein, K., Coulibaly, D., Stenchly, K., Goetze, D., Porembski, S., Lindner, A., Konaté, S., Linsenmair, E.K., 2017. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17970-2>
- Straw, E.A., Carpentier, E.N., Brown, M.J.F., 2021. Roundup causes high levels of mortality following contact exposure in bumble bees. *J. Appl. Ecol.* 58, 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13867>
- Tang, Q., Tang, J., Ren, X., Li, C., 2020. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ. Pollut.* 261, 114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Therneau, T.M., 2020. *survival: A Package for Survival Analysis in R*. R Packag. version 2.38.
- Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von

- Mérey, G., 2014. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 463–470. <https://doi.org/10.1002/ieam.1529>
- Tomé, H.V.V., Schmehl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S.M., Ravaiano, S. V., Guedes, R.N.C., Martins, G.F., Ellis, J.D., 2020. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environ. Pollut.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113420>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarry, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vázquez, D.E., Balbuena, M.S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., Farina, W.M., 2020a. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>
- Vázquez, D.E., Iliina, N., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M., 2018. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205074>
- Vázquez, D.E., Latorre-Estivalis, J.M., Ons, S., Farina, W.M., 2020b. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environ. Pollut.* 261, 114148. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114148>
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A. V., Weaver, D., Tsutsui, W.D., 2006. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* (80-. ). 314, 642–645. <https://doi.org/10.1126/science.1132772>
- Wiley, J., Sons, H.I., 2010. *A textbook of modern toxicology*. New Jersey e Canada.
- Wiley, J., Sons, I., 2004. *The honey bee colony as a superorganism*.
- Willmer, P.G., Stone, G.N., 1989. Incidence of entomophilous pollination of lowland coffee (*Coffea canephora*); the role of leaf cutter bees in Papua New Guinea. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 113–124. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb02380.x>
- WorldAtlas, 2021. Top Pesticide Using Countries [WWW Document]. URL <https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>

- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H., 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101, 1743–1748. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1743>
- Yu, S.J., Robinson, F.A., Nation, J.L., 1984. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 360–368. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90029-4)
- Zaluski, R., Kadri, S.M., de Souza, E.A., da Silva, V.M.C., da Silva, J.R.C., Rodrigues-Orsi, P., Orsi, R. de O., 2014. Africanized honeybees in urban areas: A public health concern. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 659–662. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0254-2013>
- Zattara, E.E., Aizen, M.A., 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* 4, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>
- Zgurzynski, M.I., Lushington, G.H., 2019. Glyphosate impact on *Apis mellifera* navigation: A combined behavioral and cheminformatics study. *Pharmacol. Toxicol.* 7, 806–824.
- Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus 1, 125–144.
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., Wang, H., Liu, Z., Guo, X., Xu, B., 2020. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Sci. Total Environ.* 744, 140819. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140819>
- Zhu, Y.C., Adamczyk, J., Rinderer, T., Yao, J., Danka, R., Luttrell, R., Gore, J., 2015. Spray Toxicity and Risk Potential of 42 Commonly Used Formulations of Row Crop Pesticides to Adult Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 108, 2640–2647. <https://doi.org/10.1093/jee/tov269>
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J., Luttrell, R., 2017a. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176837>
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J., Luttrell, R., 2017b. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue

concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). PLoS One 12, 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421>

## 7 CONCLUSÕES

- A literatura encontrada mostra que a exposição crônica ou aguda, por via alimentar, tópica ou por contato, do herbicida GLY (puro ou formulado) a abelhas (solitárias ou sociais) pode desencadear efeitos subletais nestes insetos.
- A literatura encontrada mostra que exposição crônica ou aguda pela via alimentar, contato e pulverização do herbicida GLY (puro ou formulado) a abelhas (solitárias ou sociais) pode desencadear efeitos letais em doses ecologicamente relevante e recomendadas pelos fabricantes.
- O herbicida GLY (RT - formulado) pode causar mortalidade e danos no comprimento do epitélio do intestino médio em *A. mellifera* quando expostas cronicamente por via alimentar, em condições de laboratório, na dose recomendada e diluições 50% e 75%. Já a exposição aguda por via oral pode afetar a capacidade de caminhada. Doses menores do que as recomendadas pelo fabricante (produto RT) não causaram efeito na sobrevivência das abelhas. O RT não afetou o deslocamento vertical e retomada de voo.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho propôs testar a toxicidade do herbicida GLY para as abelhas, e como resultado, obteve-se informações importantes sobre o tema proposto. Este herbicida é o agrotóxico mais vendido em todo mundo. O surgimento de plantas invasoras resistentes ao GLY, juntamente com o desenvolvimento de culturas transgênicas, estimulou os agricultores a dobrar a concentração desse produto durante a aplicação, ou até mesmo, aplicá-lo repetidamente. Isso tem possibilitado o acúmulo de GLY e seus metabólitos no ambiente. Apicultores integrantes da associação de apicultores de Passo Fundo (Passo Fundo - Rio Grande do Sul), relatam que nos últimos anos, as colônias de *A. mellifera* estão cada vez com menos abelhas, o que é uma preocupação, pois muitos apicultores criam as abelhas próximo a plantações que utilizam produtos à base de GLY. No geral, os apicultores não recebem aviso prévio do momento das aplicações, e durante a pulverização ou em contato com uma planta recém pulverizada, de modo que as abelhas podem se expor a altas doses desse princípio ativo. Não se pode, portanto, descartar que tal fato esteja relacionado com o declínio populacional das abelhas, pois os produtos à base de GLY podem desencadear efeitos letais e subletais (severos) nas abelhas.

Em tal contexto, surge a necessidade de repensar as estratégias de controle das plantas invasoras, buscando reduzir o uso deste herbicida, utilizando-o somente quando o número de plantas invasoras ultrapassar o nível de dano econômico, ou buscar alternativas como o controle biológico. Isso é um desafio, pois a agricultura moderna tornou-se dependente do uso de agrotóxicos, inclusive do GLY, para suprir a demanda alimentícia, uma vez que a população mundial tem crescido exponencialmente ao longo das décadas.

Os resultados apresentados nesse estudo irão contribuir para o direcionamento de novas pesquisas sobre toxicidade do GLY formulado para as abelhas. Observou-se que o RT causou danos na altura do epitélio do intestino médio de operárias da abelha *A. mellifera* africanizada. Isso abre um “leque” de possibilidades, visto que tal produto também pode desencadear outros problemas relacionados a morfofisiologia destes animais, por exemplo, do intestino médio. Em tal contexto, a necessidade de pesquisas que avaliem os efeitos letais e subletais do GLY, principalmente formulado, é de extrema importância para o entendimento do porquê o número populacional de abelhas vem diminuindo a cada ano. Nesse sentido,

necessita-se de pesquisas que avaliem a toxicidade do GLY para abelhas nativas e *A. mellifera* africanizada. Sendo assim, novos estudos que avaliem o efeito do RT em outros parâmetros morfométricos do intestino médio das abelhas africanizadas seriam relevantes, visto que houve danos no epitélio de revestimento do intestino médio destes animais, ou até mesmo, bioensaios com outros tecidos corporais.

## 9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A – Fotos do Apiário localizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UNEPE – Apicultura). O apiário contém 52 colônias, cada uma formada pela caixa (cinco quadros) e sobrecaixa (cinco quadros) com aproximadamente 9 a 12 mil indivíduos.



Fonte: Autores

9.2 APÊNDICE B – Fotos da montagem dos bioensaios no LABCON da UTFPR-DV. (A) Gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) cobertas com tecido Voil; (B) Sala climatizada (26 ° C ± 2 ° C, UR, 60% ± 10%, fotoperíodo de 12 h); (C, D e E) Alunos da pós-graduação durante a montagem dos experimentos; (F) Torre vertical (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura) com luz no ápice.



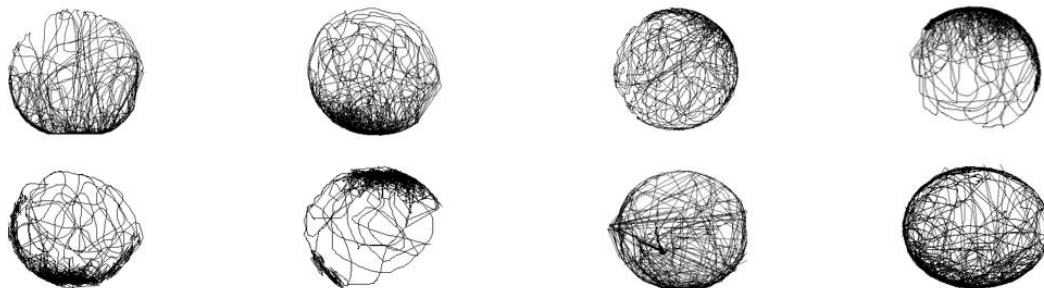
Fonte: Autores

9.3 APÊNDICE C - Caminho percorrido por abelhas *A. mellifera* africanizada 48 h após a ingestão de alimentos contendo a dose recomendada do Roundup Transorb R® (T5) e do grupo controle (T1), gerado pelo software Bee-move (em fase de registro).

---

**T1 - CONTROL**

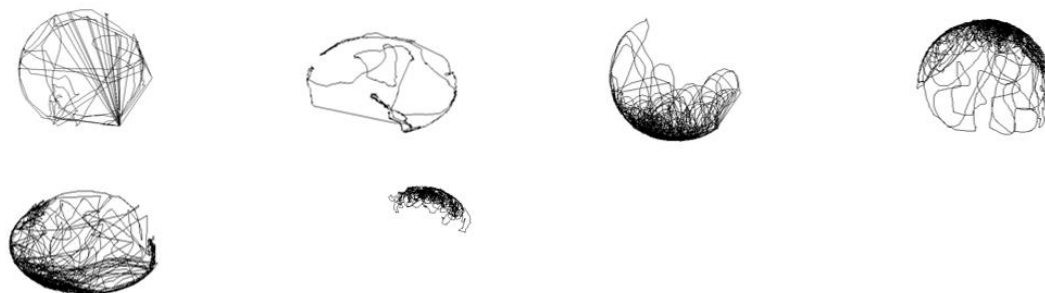
---



---

**T5 - 100% (RECOMMENDED DOSE)**

---



---

Fonte: Autores (software Bee-move)