

## Avaliação morfométrica das glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas (*Apis mellifera* L.) expostas a herbicida a base de glifosato, em condições de campo

Márcia Regina Faita<sup>1\*</sup>, Luiz Fernando Gonçalves Zanfelici<sup>2</sup>, Dylan Thomas Telles Amandio<sup>1</sup>, Afonso Inácio Orth<sup>1</sup>, Ruben Onofre Nodari<sup>1</sup>

### RESUMO

A mortalidade de abelhas em todo o mundo está também relacionada ao uso de agrotóxicos. Os herbicidas a base de glifosato (HBG), representam mais da metade dos agrotóxicos comercializados no Brasil e normalmente não estão associados a morte de abelhas. As glândulas hipofaríngeas, envolvidas na produção de geleia real, dependem da alimentação das abelhas e condições fisiológicas da colônia para se tornarem ativas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um herbicida a base de glifosato presente na alimentação energética sobre a ativação das glândulas hipofaríngeas, a partir da medida da área dos ácidos. O bioensaio foi composto por dois tratamentos, sem (controle) e com HBG (Roundup<sup>®</sup>) e 30 repetições (abelhas) por tratamento. Operárias recém emergidas foram marcadas, introduzidas nas colmeias e coletadas após seis dias. As abelhas foram dissecadas para remoção das glândulas e preparo de lâminas, que foram analisadas em microscópio confocal. Foram avaliados dez ácidos de cada abelha, totalizando 300 por tratamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância, onde foi possível observar que a concentração do herbicida adicionado ao alimento energético das abelhas, não interferiu na ativação das glândulas hipofaríngeas, a partir da medida da área dos ácidos.

**Palavras-chave:** Roundup<sup>®</sup>; operárias; colônias; ácidos.

### INTRODUÇÃO

Em *A. mellifera*, as glândulas hipofaríngeas fazem parte das glândulas anexas do sistema digestivo, responsáveis pela síntese de enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen e pela produção da geleia real (COSTA e CRUZ-LANDIM, 1999). Huang et al., (1989) verificaram que o desenvolvimento destas estruturas em abelhas operárias pode ser muito variável, sendo afetado por fatores internos e externos à colônia. As diferentes atividades desempenhadas por indivíduos da mesma idade e a presença de larvas jovens são essenciais para a ativação das glândulas hipofaríngeas (PERNAL e CURRIE, 2000).

A ação de inseticidas neonicotinoides e acaricidas, utilizados respectivamente em lavouras e no interior das colmeias, reduz o tamanho dos ácidos glandulares devido a morte celular nestas estruturas (HATJINA et al., 2013). Abelhas nutrizas expostas ao fipronil e piraclostrobina (isoladas ou em associação), em um período de seis dias, apresentaram alterações nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (ZALUSKI et al., 2017). Além disso, Faita et al. (2018) encontraram alterações ultraestruturais nas glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas submetidas a alimentação proteica contendo Roundup<sup>®</sup>, com regressão precoce destas estruturas.

As formulações comerciais de herbicidas a base de glifosato apresentam ingredientes “inertes”, que podem ser mais tóxicos que seu princípio ativo isolado (WILLIAMS et al., 2000; MESNAGE et al., 2012). Alguns destes podem ter efeitos tóxicos sobre abelhas, diminuindo a saúde de suas populações (ZHU et al., 2014; MULLIN et al., 2016) e prejudicando seu desempenho de aprendizagem (CIARLO et al., 2012). Como os herbicidas não são destinados para uso contra

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis - Brasil; <sup>2</sup>. Szent István University, Faculty of Horticultural Science, Budapest - Hungria

\* marcia.faita@gmail.com

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

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma concentração subletal de Roundup® presente no alimento energético das abelhas sobre a ativação das glândulas hipofaríngeas de nutrizes, a partir da medida da área dos ácinos glandulares. Foi utilizada a formulação comercial do Roundup® em detrimento do glifosato em grau analítico, com a intensão de simular situações reais do uso de produtos comerciais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O bioensaio foi realizado no período de setembro a novembro de 2016 no Apiário Experimental (27°32'12.28"S, 48°30'5.82"O), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi composto por dois tratamentos, sem (controle) e com HBG (Roundup®) e 30 repetições (abelhas), distribuídas em três núcleos com população média de 4.000 indivíduos, contendo rainha e área de cria em diferentes estádios. A alimentação correspondente a cada tratamento consistiu em 200 mL de xarope de açúcar, para as colmeias do grupo controle. Este mesmo alimento misturado com 1,5 µL de Roundup® (2,16 µg i.a. g<sup>-1</sup>), foi fornecido às abelhas no tratamento "Roundup®". O alimento foi fornecido semanalmente em alimentadores internos de superfície. Durante o bioensaio, as colmeias permaneceram com livre entrada de pólen.

As abelhas foram retiradas de quadros de cria provenientes de uma colmeia doadora e mantidas em

B.O.D. ( $\pm 28$  °C;  $\pm 60$  % U.R.) para emergência dos imagos. Posteriormente, foram marcadas no tórax com tinta atóxica (Posca Paint Pens, Mitsubishi Pencil, Japan) e cada colmeia recebeu em média 35 indivíduos, onde foi fornecido o alimento referente a cada tratamento. No sexto dia após a introdução na colmeia, as abelhas foram coletadas, mortas, fixadas por 48 horas em solução Dietrich e posteriormente, acondicionadas em álcool a 70%. As abelhas foram dissecadas e as glândulas foram preparadas em lâminas de vidro com Meio de Hoyer, cobertas com lamínula e mantidas em estufa (60 °C) por sete dias. Para observações e registro das imagens, as lâminas foram analisadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. A área dos ácinos ( $\mu\text{m}^2$ ) foi mensurada em fotomicrografias tomadas aleatoriamente de dez ácinos das glândulas de cada abelha, totalizando 300 ácinos por tratamento. Os dados foram submetidos a Análise de Variância, utilizando o programa PAST ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste F.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da análise da variância obtidos para a medida da área dos ácinos das glândulas hipofaríngeas não indicaram diferença significativa entre os tratamentos ( $F = 2,61$ ;  $p = 0,11$ ). Foi observado que, independentemente do tipo de alimentação, as abelhas apresentaram ácinos glandulares com tamanho correspondente aos de glândulas ativas. A área média dos ácinos foi de 36.794,5 ( $\pm 8.341,2$ )  $\mu\text{m}^2$  e 40.150,2 ( $\pm 7.529,7$ )  $\mu\text{m}^2$  para os tratamentos controle e Roundup®, respectivamente. Nossos resultados foram similares aos descritos por Crailsheim e Stolberg (1989) e Deseyn e Billen (2005). A partir desta análise, é possível inferir que a avaliação morfométrica dos ácinos não se constitui em indicador de efeito diferencial do herbicida Roundup® presente apenas no alimento energético, não sendo indicado para determinar efeitos na ativação das glândulas hipofaríngeas. Outra possibilidade é que abelhas nutrizes não consumiram alimento energético contendo herbicida em quantidade suficiente para reduzir o tamanho dos ácinos glandulares.

De acordo com Huang et al. (1989), existe uma relação positiva entre o tamanho dos ácinos e a atividade glandular. Entretanto, os referidos autores afirmam que não é o tamanho da glândula que

determina se ela está ativa ou não, sendo que uma glândula grande pode ter a síntese proteica inibida caso não ocorra excreção, devido a um mecanismo de *feedback* negativo. Faita et al. (2018) observaram que a presença do Roundup® na alimentação de abelhas nutrizas promoveu alterações acentuadas no retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias das glândulas hipofaríngeas, além de aparência esponjosa, ácinos grandes e túrgidos, sugerindo o acúmulo de secreção. Deste modo, é possível que mesmo sem apresentar diferenças significativas no tamanho dos seus ácinos, as atividades celulares destas estruturas estejam comprometidas em função dos tratamentos administrados.

A idade e a função que as abelhas desenvolvem dentro da colmeia é um dos fatores que induzem a ativação das glândulas (WINSTON, 2003), sendo o contato das abelhas nutrizas com área de cria essencial para a síntese de proteínas (LASS e CRAILSHEIM, 1996). Todas as colmeias do bioensaio apresentavam rainha com boa taxa de postura e larvas jovens, em diferentes estágios de desenvolvimento. Uma vez que a relação entre o tamanho da glândula e a atividade não é direta, o uso da morfologia e/ou do tamanho da glândula como medidas para estimar sua atividade (MAURIZIO, 1954) pode não ser adequado.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a presença de concentrações subletais do Roundup® na alimentação energética das abelhas, não interferiu na área dos ácinos das glândulas hipofaríngeas, não sendo um parâmetro seguro para indicar efeitos do herbicida sobre abelhas. Contudo, estes resultados devem ser interpretados com cautela, haja vista os prejuízos dos herbicidas a base de glifosato em abelhas reportados em muitos estudos, especialmente Faita et al. (2018), que abordam especificamente alterações em organelas celulares das glândulas hipofaríngeas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CIARLO, T. J.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L.; SCHMEHL, D. R. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS ONE*, v.7, n.7, p.e40848, 2012.
- COSTA, R. C.; CRUZ-LANDIM, C. DA. Occurrence and morphometry of the hypopharyngeal glands in *Scaptotrigona postica* Lat. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Bioscience Journal*, v.24, n.1, p.97–102, 1999.
- CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v.35, n.8, p.595–602, 1989.
- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, v. 36, n. 1, p. 49–57, 2005.
- FAITA, M. R.; OLIVEIRA, E. DE M.; ALVES, V. V.; ORTH, A. I.; NODARI, R. O. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere*, v.211, p.566–572, 2018.
- HATJINA, F.; PAPAETHIMIOU, C.; CHARISTOS, L.; et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, v.44, n.4, p.467–480, 2013.

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

JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology. *Annual Review of Entomology*, v.60, n.1, p.415–434, 2015.

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

MAURIZIO, Anna. Pollen nutrition and vital processes in the honey bee. *Landw. Jb. Schweiz*, v.68, p.115-182, 1954.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, v.314, n.2–3, p.122–128, 2012.

MULLIN, C. A.; FINE, J. D.; REYNOLDS, R. D.; FRAZIER, M. T. Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. *Frontiers in Public Health*, v.4, n.92, p.1–8, 2016.

PERNAL, S. F.; CURRIE, R. W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, v.31, n.3, p.387–409, 2000.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, v.8, n.7, p.e70182, 2013.

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

WINSTON, M.L. *A biologia da abelha*. Livraria e Editora Magister. Porto Alegre - RS, 276p. 2003.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. DE O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, v.7, n.1, p.1-10, 2017.

ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE*, v.9, n.1, p.e77547, 2014.