

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

FERNANDA CAROLINE COLOMBO

**LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* ALIMENTADAS  
COM DIETA INCORPORADA COM ENTOMOPATÓGENOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Dois Vizinhos

2016

FERNANDA CAROLINE COLOMBO

**LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* ALIMENTADAS  
COM DIETA INCORPORADA COM ENTOMOPATÓGENOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bióloga.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele Potrich

Dois Vizinhos

2016





## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais por toda confiança depositada em mim e por não medirem esforços para sempre me darem o melhor. Obrigada por todo o amor, carinho, incentivo e compreensão nos momentos em que estivemos longe. Vocês são exemplo de determinação que eu vou levar para toda minha vida. Amo vocês mais do que tudo!

À minha irmã Michele, que mesmo longe sempre esteve presente, por toda a amizade e carinho. À ela e meu cunhado Tiago, por terem me dado o melhor presente da minha vida, minha sobrinha Beatriz.

Ao meu namorado Rodrigo por toda paciência, carinho, atenção e compreensão. Por ser muito mais do que um namorado, mas por ser amigo, parceiro e ser minha família aqui em Dois Vizinhos. Por nunca ter negado me auxiliar e por estar sempre presente nos melhores e piores momentos. Você foi essencial nessa etapa da minha vida!

À toda minha família, que sempre estava me esperando nos feriados na casa da vó para nos encontrarmos. Pelos momentos de descontração e por todo o amor que sempre me deram.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele Potrich, por confiar em mim, pela paciência, orientação, compreensão e por ser muito além do que apenas uma orientadora, mas também por ser amiga, “mãe” e por ser uma pessoa incrível, você é um exemplo a ser seguido. Obrigada por todas as conversas, conselhos e cafés, você foi essencial na minha formação.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Everton Ricardi Lozano da Silva, por ter me acolhido no laboratório desde o 1<sup>o</sup> semestre da faculdade, por nunca ter me negado ajuda e por todos os conselhos que com certeza auxiliaram muito na minha formação.

Às minhas amigas de infância e da vida, Laura, Ana Bárbara, Alini, Jessika e Priscila, por todos os encontros, pelas conversas e principalmente pela amizade, que independente da distância, sempre deram um jeitinho de se fazerem presente.

Às minhas amigas Maiara e Maikely, por toda a ajuda e auxílio e por serem sempre tão presentes. Obrigada pelos momentos de descontração e por terem deixado minha graduação mais alegre, sou muito grata por ter conhecido vocês.

À todos os professores de Ciências Biológicas da UTFPR-DV, que com certeza foram essenciais na minha formação.

## RESUMO

COLOMBO, Fernanda C. **Longevidade de operárias de *Apis mellifera* alimentadas com dieta incorporada com entomopatógenos**. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) são insetos sociais, considerados úteis, devido sua importância para os ecossistemas, pois são responsáveis por mais de 80% da polinização de espécies vegetais cultivadas no mundo e são produtoras de mel, própolis, geleia real, cera e apitoxina. Porém, as abelhas estão sofrendo com a desordem do colapso das colônias e um dos principais suspeitos deste problema é a utilização descontrolada de inseticidas químicos sintéticos. Uma das alternativas para reduzir a utilização destes é o uso do controle biológico microbiano, no entanto, os efeitos da utilização de bioinseticidas (entomopatógenos) sobre *A. mellifera* ainda é pouco elucidado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a longevidade de operárias de *A. mellifera* alimentadas com dieta incorporada com os entomopatógenos comerciais *B. bassiana* e *B. thuringiensis* e verificar possíveis alterações morfológicas em seu mesêntero, em condições de laboratório. Para isto, os entomopatógenos utilizados foram *B. bassiana* (Produto A), na concentração de  $5,0 \times 10^{11}$  conídios viáveis.kg<sup>-1</sup>, *B. thuringiensis* (Produto B), na concentração de  $2,5 \times 10^9$  esporos viáveis.g<sup>-1</sup> e (Produto C), na concentração de  $1,0 \times 10^9$  esporos viáveis.g<sup>-1</sup>. Foram preparadas duas testemunhas, T1: água destilada esterilizada e T2: água destilada esterilizada + Tween 80<sup>®</sup> (0,01%). Para os bioensaios, 2 mL de cada tratamento foi incorporado à pasta Cândi (100g de açúcar de confeitiro e 20mL de mel). Para cada tratamento 80 abelhas foram acondicionadas, individualmente, em tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm Ø), cobertos com tecido *voil*, contendo um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi com os tratamentos. Os tubos contendo as abelhas foram acondicionados em câmara climatizada (30 ± 2°C, U.R. 70% ± 10%, 12 h) e a mortalidade foi avaliada a cada seis horas, durante 10 dias. Logo após a verificação da mortalidade, foram separadas e selecionadas, aleatoriamente, duas abelhas por tratamento para a retirada do mesêntero, sendo estes fixados em Karnovsky modificado. As amostras de mesêntero foram processadas em metodologia padrão para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Verificou-se que os produtos A, B e C reduziram a longevidade das abelhas (60,45, 64,12 e 62,47 horas, respectivamente), quando comparados às testemunhas T1 e T2 (72,97 e 80,77 horas, respectivamente). Nas análises qualitativas, realizadas em MEV do mesêntero não foi possível observar alterações morfológicas externas ou internas nos tecidos. Observou-se a integridade dos mesmos, sem sinal de ruptura ou danos decorrentes do efeito dos produtos. Também não foi verificada a presença de *B. bassiana* e/ou *B. thuringiensis* nas amostras analisadas. Apesar dos produtos A, B e C causarem redução na longevidade, não foi verificada a presença dos mesmos quando os tecidos foram analisados por MEV.

**Palavras-chave:** Seletividade. Abelha africanizada. Inseticidas biológicos. Microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

COLOMBO, Fernanda C. **Longevity of workers of *Apis mellifera* fed with a diet incorporated with entomopathogenic**. 2016. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

*Apis mellifera* Linnaeus, 1758 bees Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) are social insects, considered useful because of their importance to ecosystems, because they are responsible for over 80% of the pollination of cultivated plant species in the world and they are honey, propolis, royal jelly, wax and apitoxin producers. But the bees are suffering from the colony collapse disorder and one of the main suspects of this problem is the uncontrolled use of synthetic chemical insecticides. One of the alternatives to reduce the use of these is the use of microbial biological control, however, the effects of bioinsecticides (entomopathogens) on *Apis mellifera* are still poorly elucidated. The objective of this work was to evaluate the longevity of the workers of *A. mellifera* fed with a diet incorporated with commercial entomopathogenic *B. bassiana* and *B. thuringiensis*, and check possible morphological changes in their midgut, in laboratory conditions. For this, the entomopathogenic fungi and bacteria used were *B. bassiana* (Product A) in a concentration of  $5.0 \times 10^{11}$  viable conidia.kg<sup>-1</sup>, *B. thuringiensis* (Product B, called BtB) in a concentration of  $2.5 \times 10^9$  viable spores.mg<sup>-1</sup> and (C Product, called BtC) in a concentration of  $1.0 \times 10^9$  viable spores.mg<sup>-1</sup>. Two controls were prepared, T1: sterile distilled water and: T2: sterile distilled water + Tween 80<sup>®</sup> (0.01%). For bioassays, 2 ml of each treatment were incorporated into Candi paste (100g icing sugar and 20 ml honey). For each treatment 80 bees were placed, individually, in flat-bottomed glass tubes (Ø 2.5 cm), covered with cheesecloth containing a piece of cotton soaked in sterile distilled water and Candi folder treatments. The tubes containing the bees were kept in climate chamber (30 ± 2 ° C, U.R. 60% ± 10%, 12 h) and mortality was assessed every six hours for 10 days. Right after the verification of mortality, two bees were separated and randomly selected per treatment for removing the midgut, being these fixed in modified Karnovsky. Midgut samples were processed in standard methodology for Scanning Electron Microscopy (SEM). It was found that the products A, B and C decreased longevity of bees (60,45, 64,12 and 62, 47 hours, respectively) when compared to the witness T1 and T2 (72.97 and 80.77 hours, respectively). In qualitative analysis, carried out in midgut SEM, it was not possible to observe external or internal morphological changes in tissues. It was verified their integrity without breaking signal or damage resulting from the product effect. It wasn't also verified the presence of *B. bassiana* and/or *B. thuringiensis* in the samples. Although the products A, B and C cause reduced longevity, it was not observed the presence of the entomopathogenic fungi and bacteria when the tissues were analyzed by SEM.

**Keywords:** Selectivity. Africanized bee. Biopesticides. Scanning electron microscopy.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Ciclo de desenvolvimento (dias) das crias de rainha, operária e zangão de <i>Apis mellifera</i> .....	16
Quadro 2: Produtos registrados à base de <i>Beauveria bassiana</i> disponíveis no mercado e insetos e ácaros alvos (nome científico e nome comum).....	22
Quadro 3: Produtos registrados à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> disponíveis no mercado e insetos-praga controlados (nome científico e nome comum).....	24
Quadro 4: Tratamentos e concentrações utilizados para a realização dos experimentos.....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Favo tipo langstroth de cria operculada para criação de <i>A. mellifera</i> , disponível na UNEPE Apicultura da UTFPR.....	28
Figura 2: A) Tubo de fundo chato, contendo uma operária de <i>A. mellifera</i> , coberto com tecido <i>voil</i> ; B) Algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi incorporada com os tratamentos.....	29
Figura 3: Acondicionamento dos tubos de fundo chato em estufa tipo B.O.D. contendo as operárias de <i>A. mellifera</i> .....	30
Figura 4: A) Dissecção e retirada do mesêntero das operárias de <i>A. mellifera</i> ; B) Amostras dos mesênteros acondicionadas em fixador Karnovsky, em tubos eppendorf; C) Lavagem dos mesênteros em tampão fosfato; D) Fixação dos mesênteros em solução de tetróxido de ósmio 1%.....	34
Figura 5: A) Desidratação das amostras de mesêntero com CO <sub>2</sub> em Ponto Crítico BAL-TEC (modelo CPD 030); B) Amostras de mesêntero montadas em suporte metálico ( <i>stubs</i> ) contendo cola de prata; C) Metalização das amostras em Metalizador BAL-TEC (modelo SCD-050); D) Análise das amostras em Microscópio Eletrônico de Varredura, em alto vácuo de intensidade de feixe de elétrons.....	35
Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de <i>A. mellifera</i> , após ingestão de pasta Cândi incorporada com <i>B. thuringiensis</i> , produto B. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Aumento de 3000x do mesêntero; D) Traquéias do mesêntero.....	40

<p>Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de <i>A. mellifera</i>, após ingestão de pasta Cândi incorporada com <i>B. thuringiensis</i>, produto C. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traquéias do mesêntero; D) Aumento de 3000x do mesêntero.....</p>	41
<p>Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de <i>A. mellifera</i>, após ingestão de pasta Cândi incorporada com a testemunha água, T1. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Aumento de 1200 x do mesêntero; D) Traqueias do mesêntero.....</p>	42
<p>Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de <i>A. mellifera</i>, após ingestão de pasta Cândi incorporada com a testemunha água com Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%), T2. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traqueias do mesêntero; D) Aumento de 800x do mesêntero.....</p>	43
<p>Figura 10: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de <i>A. mellifera</i>, após ingestão de pasta Cândi incorporada com <i>B. bassiana</i>. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traqueias do mesêntero; D) Traqueias do mesêntero.....</p>	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Longevidade (em horas) de operárias de <i>Apis mellifera</i> após fornecimento de pasta Cândi incorporada com os entomopatógenos. Temperatura $30 \pm 2$ °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$ . UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.....	37
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 APICULTURA .....	14
2.2 ABELHA AFRICANIZADA <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) .....	15
2.2.1 Caracterização e biologia de <i>A. mellifera</i> .....	15
2.2.2 Comportamento social de <i>A. mellifera</i> .....	16
2.3 DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS .....	18
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO COM ENTOMOPATÓGENOS .....	19
2.4.1 Fungos entomopatogênicos .....	20
2.4.2 Bactéria entomopatogênica <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
2.5 SELETIVIDADE DE ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVO DA ORDEM HYMENOPTERA .....	26
2.5.1 Fungos entomopatogênicos sobre organismos não-alvo da Ordem Hymenoptera .....	26
2.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre organismos não-alvo da Ordem Hymenoptera .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 OBTENÇÃO DOS ENTOMOPATÓGENOS .....	30
3.2 OBTENÇÃO DAS ABELHAS <i>Apis mellifera</i> .....	31
3.3 BIOENSAIO: EFEITO DOS ENTOMOPATÓGENOS INCORPORADOS À PASTA CÂNDI, SOBRE OPERÁRIAS DE <i>A. mellifera</i> .....	32
3.4 ANÁLISE DO MESÊNTERO DE OPERÁRIAS DE <i>A. mellifera</i> UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
4.1 BIOENSAIO: EFEITO DOS ENTOMOPATÓGENOS INCORPORADOS À PASTA CÂNDI, SOBRE OPERÁRIAS DE <i>A. mellifera</i> .....	36
4.2 ANÁLISE DO MESÊNTERO DE OPERÁRIAS DE <i>A. mellifera</i> UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	39
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas estão classificadas na ordem Hymenoptera, família Apidae, na qual são conhecidas, aproximadamente, vinte mil espécies diferentes (RAMOS; CARVALHO, 2007). As abelhas *Apis mellifera* L., 1758 são importantes nos ecossistemas, pois são responsáveis pela polinização de espécies vegetais (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a), são produtoras de mel, própolis, geleia real, cera e apitoxina (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010). No setor de produção de mel, o Brasil se encontra em 8º lugar no *ranking* de países exportadores (ABEMEL, 2015).

Para a realização de todas essas atividades, são necessários a rainha, operária e zangão, três castas que compõem uma colônia de *A. mellifera*. No entanto, destaque especial é dado às operárias, que são os indivíduos em maior quantidade na colônia e são responsáveis pela coleta de pólen, néctar, alimentação da rainha, limpeza, defesa, produção de mel, geleia real e própolis (GULLAN; CRANSTON, 2009; APACAME, 2016). No momento da coleta de néctar e pólen, as operárias podem entrar em contato com micro-organismos, os levando para a colônia, onde pode ocorrer infecção e disseminação, pois é um local propício para o desenvolvimento destes. Neste momento da coleta, pode ocorrer ainda a contaminação com outros agentes, como os inseticidas químicos sintéticos ou biológicos, e assim, esses fatores podem contribuir para o aumento da mortalidade das colônias (FRIES; CAMAZINE, 2001).

Em 2006, nos Estados Unidos, ocorreu o primeiro caso de Desordem do Colapso das Colônias (DCC), onde milhares de colônias de *A. mellifera* foram perdidas, gerando prejuízos para a agricultura (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010). Em 2008 ocorreu o primeiro relato de desordem do colapso das colônias no Brasil, no estado de São Paulo. Os estados de Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais também já relataram perdas de colônias (MESSAGE et al., 2011). Vários fatores podem estar ocasionando esse fenômeno, dentre eles, e de forma mais agravante no Brasil, a utilização indiscriminada de produtos químicos sintéticos para o controle de insetos-praga (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; KAPLAN, 2012; RUCKER; THURMAN, 2012).

Com o surgimento de insetos resistentes a diversos inseticidas químicos sintéticos, os produtores procuram métodos alternativos de controle, que não causem resistência da praga e que não cause consequências danosas ao meio ambiente e à saúde animal, além de diminuir ou evitar a DCC (SILVA; BRITO, 2015). Uma dessas alternativas é a utilização de agentes de controle biológico, como o controle microbiano de insetos. Dentre os agentes de controle microbiano têm-se fungos e bactérias entomopatogênicas (ALVES, 1998) e esse tipo de controle vem aumentando de maneira geral, devido à necessidade de controlar insetos-praga.

Embora a utilização do controle biológico, com entomopatógenos, possua vantagens em relação aos químicos sintéticos, são necessários estudos para avaliar os possíveis efeitos destes sobre organismos não-alvos e, em especial, sobre as abelhas *A. mellifera*. Neste sentido, trabalhos vêm sendo realizados a fim de avaliar o efeito de entomopatógenos sobre *A. mellifera*. Dentre estes, Simionatto (2013) verificou que ao fornecer o produto comercial formulado à base de *B. thuringiensis*, incorporado na pasta Cândi, na concentração de 0,3g/100 mL, este não interferiu na longevidade das operárias de *A. mellifera* (100,10 horas), quando comparado à testemunha (80,20 horas).

Em outro estudo, Silva (2014) verificou que a bactéria *Bacillus thuringiensis*, oriunda de um produto comercial, não provocou alterações morfológicas ou morfométricas no mesêntero de *A. mellifera*, alimentadas com pasta Cândi incorporada com este entomopatógeno.

O fungo *Beauveria bassiana*, testado para controlar o percevejo do algodão, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), não provocou mortalidade em abelhas *A. mellifera*, apesar de ter controlado o percevejo (AL MAZRA'AWI et al., 2006). Este mesmo fungo, oriundo de produto comercial, não provocou alterações morfológicas ou morfométricas no mesêntero das operárias de *A. mellifera*, quando alimentadas com pasta Cândi incorporada com o mesmo (SILVA, 2014).

Embora a utilização de inseticidas químicos sintéticos seja maior, pequenos produtores já adotaram o controle biológico microbiano, aliado a outras alternativas de controle, como feromônios sexuais, entomófagos, métodos físicos, entre outros e houve um aumento das áreas tratadas com esses agentes (SILVA; BRITO, 2015).

Os fungos e bactérias entomopatogênicos utilizados no controle biológico não são neurotóxicos, não possuindo efeito inseticida imediato e, portanto, poderiam ser levados às colônias, sem que prejudicassem as abelhas (GALLO et al., 2002).

Porém, estes podem agir por contato, no caso dos fungos, e por ingestão, no caso das bactérias, assim as abelhas podem se contaminar com esses agentes, o que também pode comprometer a colônia a longo prazo, ou ainda causar efeitos colaterais no sistema digestório dessas, como perfurações ou rupturas e redução das microvilosidades, no caso das bactérias.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a longevidade de operárias de *A. mellifera* alimentadas com dieta incorporada com os entomopatógenos comerciais *B. bassiana* e *B. thuringiensis*, e verificar possíveis alterações morfológicas em seu mesêntero, em condições de laboratório.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 APICULTURA

As abelhas são pertencentes à ordem Hymenoptera e à família Apidae, sendo conhecidas, aproximadamente, vinte mil espécies diferentes, destacando-se as abelhas da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (RAMOS; CARVALHO, 2007). Este destaque é devido a importância desses organismos para os ecossistemas, pois são responsáveis por mais de 80% da polinização de espécies vegetais cultivadas no mundo, devido seu hábito alimentar, visto que se alimentam de néctar e pólen, em maior quantidade, e necessitam levar alimento às colônias (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a; HORIZONTE GEOGRÁFICO, 2016). Também auxiliam na preservação da biodiversidade e são produtoras de mel, própolis, cera, geleia real e apitoxina, todos produtos úteis aos animais e de importância econômica (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; FREITAS; PINHEIRO, 2012).

Em relação à produção de mel pelas abelhas, esse produto tem se destacado na renda dos produtores brasileiros. Neste setor, o Brasil se encontra em 8º lugar no ranking dos países exportadores de mel, com US\$ 98.576.057,00 por ano. No ano de 2015 o Brasil exportou 22.205.764 toneladas, envolvendo US\$ 81.719.968,00. O Paraná, em 2014, exportou 3.084.099 toneladas, com uma receita de US\$ 11.737.157,00 (ABEMEL, 2015).

O aumento na produção de mel se deve a africanização de abelhas do gênero *Apis*. Este fato iniciou-se em 1950, quando houve o surgimento de doenças e pragas nas colônias, gerando prejuízos econômicos aos apicultores. Com isso, o pesquisador Dr. Kerr iniciou estudos sobre abelhas africanas *A. mellifera scutellata*. Em 1956, viajou até a África para selecionar rainhas africanas resistentes a doenças. Entretanto, algumas das colônias trazidas da África enxamearam e cruzaram com subespécies já existentes no Brasil, originando as abelhas africanizadas *A. mellifera* (PEREIRA et al., 2003).

## 2.2 ABELHA AFRICANIZADA *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

### 2.2.1 Caracterização e biologia de *A. mellifera*

A abelha, assim como todos os representantes da classe Insecta, possui um exoesqueleto constituído de quitina e apresenta o corpo dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. Seu aparelho bucal é do tipo lambedor, composto por duas mandíbulas e a língua (glossa). As mandíbulas são utilizadas para alimentar as larvas, limpar os favos e auxiliam na defesa e a língua é utilizada para coleta e transferência de alimento (PEREIRA et al., 2003). O tórax é composto por três segmentos; sendo que em cada, há um par de pernas e os dois posteriores apresentam um par de asas cada. As pernas posteriores possuem uma estrutura denominada corbícula, com função de transporte de pólen e resinas (COUTO; COUTO, 2002; CRUZ-LANDIM, 2009). O abdome possui sete segmentos, que contém estruturas que fazem parte sistema digestório e o sistema ovipositor modificado, ferrão (COUTO; COUTO, 2002).

Dentre os sistemas internos, têm-se o sistema digestório, que é dividido em três regiões: estomodeu ou intestino anterior, mesêntero ou ventrículo e proctodeu ou intestino posterior. É no mesêntero que ocorre a absorção de nutrientes, pois apresenta invaginações e microvilosidades, aumentando a superfície de troca e aumento da absorção celular e é o local onde ocorre a maior parte da digestão, sendo considerado o estômago funcional dos insetos (CRUZ-LANDIM, 2009). As abelhas *A. mellifera* são consideradas grandes, quando comparadas a outros indivíduos da família Apidae, medem aproximadamente 11 mm de comprimento, possuem um abdômen largo, com quitinas escuras e há a presença de pêlos (COUTO; COUTO, 2002).

O ovo das abelhas é cilíndrico, com medidas de 1,6 mm de comprimento e 0,4 mm de altura. Possui uma pequena abertura no seu final anterior, denominado micrópila, onde ocorre a penetração dos espermatozoides. A larva é vermiforme, sem pernas ou asas, possui uma cabeça pequena e 13 segmentos não diferenciados em tórax e abdômen e durante esse estágio estoca alimento em seu corpo. A larva passa por cinco estágios de crescimento, onde ocorre a troca da

cutícula e antes da última troca, esta tece seu casulo (COUTO; COUTO, 2002). No período de pupa as antenas, asas e pernas são evertidas, ocorre a distinção dos olhos compostos e peças bucais, formação de pêlos e separação da cabeça, tórax e abdômen, até a transformação em um indivíduo adulto (PEREIRA et al., 2003). Cada colônia de *A. mellifera* é formada por três diferentes castas: rainha, operárias e zangões e estes possuem ciclo de desenvolvimento diferentes (Quadro 1).

Tempo de desenvolvimento em dias				
Casta/Estágios	Ovo	Larva	Pupa	Total (dias)
Rainha	3	5	7	15
Operária	3	5	12	20
Zangão	3	6,5	14,5	24

**Quadro 1: Ciclo de desenvolvimento (dias) das crias de rainha, operária e zangão de *Apis mellifera*.**

Fonte: COUTO; COUTO, 2002.

### 2.2.2 Comportamento social de *A. mellifera*

*A. mellifera* são abelhas sociais e vivem em colônias organizadas em castas, onde cada indivíduo possui função distinta na colônia (GALLO et al., 2002), que apresenta apenas uma rainha, o maior indivíduo da sociedade. A função da rainha é manutenção da ordem social e postura dos ovos, onde realiza o vôo nupcial. Assim rainhas com 5 a 7 dias de vida atraem os zangões e a cópula ocorre durante o vôo.

Cada rainha pode ser fecundada por até 17 zangões e o sêmen é armazenado na espermateca, por toda a vida reprodutiva da rainha e de três a sete dias após a cópula ocorre a postura dos ovos (COUTO; COUTO, 2002). Para a produção de uma rainha é necessário que as operárias alimentem a larva apenas com geleia real, em um alvéolo modificado, conhecido como realeira (PEREIRA et al., 2003; APACAME, 2016).

Os zangões são os indivíduos machos da colônia e possuem a função de fecundar a rainha durante o vôo nupcial e após a cópula esses indivíduos morrem (COUTO; COUTO 2002). Sua quantidade na colônia é variável, pois depende da

quantidade de alimento e da época de acasalamento. Estes não possuem função de coleta de alimento, não produzem cera e não possuem ferrão (PEREIRA et al., 2003; APACAME, 2016).

As operárias possuem glândulas de cera e apresentam uma estrutura responsável para coleta de pólen, denominada corbícula, que está presente em cada perna posterior (GULLAN; CRANSTON, 2009). Estes indivíduos são também responsáveis pelo trabalho da colmeia, como construção, limpeza, alimentação da rainha, coleta de néctar, defesa, produção de mel, geleia real e própolis (APACAME, 2016).

São os principais agentes polinizadores dos vegetais, os quais produzem substâncias que atraem as abelhas e, em troca, estas carregam o pólen das flores, que é a principal fonte de proteína para os indivíduos da colônia (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007). O fato das operárias visitarem várias flores para coletar o pólen garante aos vegetais o fenômeno de fecundação cruzada, o que aumenta a produção de frutos e sementes (COUTO; COUTO, 2002; FREITAS; PINHEIRO, 2012).

Conforme sua idade, as operárias possuem funções distintas na colônia. Nos três primeiros dias realizam a limpeza, até o 14<sup>o</sup> desenvolvem as glândulas hipofaríngeas para a produção de geleia real e são responsáveis pela nutrição da rainha, do 14<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup> desenvolvem glândulas produtoras de cera (TAUTZ, 2010) e até o 21<sup>o</sup> dia possuem a função de proteger a colmeia. Somente a partir do 21<sup>o</sup> dia é que as operárias iniciam a função de forrageamento, para coletar pólen, néctar, própolis e água (GALLO et al., 2002).

É neste momento que as operárias podem se contaminar com produtos químicos sintéticos ou podem entrar em contato com micro-organismos, como fungos, vírus e bactérias. Com isso, as operárias podem se infectar e causar a disseminação dos micro-organismos na colônia, pois há umidade e temperatura ideais para o desenvolvimento desses agentes, fator que pode agravar o sumiço das abelhas (FRIES; CAMAZINE, 2001).

### 2.3 DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS

Em 2006, a apicultura americana foi alarmada com a Desordem do Colapso das Colônias (DCC) de *A. mellifera*, na qual milhares de colônias foram perdidas por todos os Estados Unidos, gerando prejuízos consideráveis para a agricultura, devido à falta de polinizadores (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010). Um levantamento com apicultores de 15 estados do EUA relatou uma perda de 31,8% das colônias durante o inverno de 2006/2007 (RUCKER; THURMAN, 2012). A CCD se dá pela rápida perda de população de abelhas adultas, excesso de populações de crias em relação a população de abelhas adultas, pouca ou nenhuma abelha morta dentro ou fora da colônia e ausência da evidência de outros insetos (VanENGELSDORP et al., 2007).

No Brasil, o primeiro relato de DCC foi no ano de 2008, na cidade de Altinópolis, em São Paulo, onde havia muito alimento, poucas crias e poucas abelhas adultas, presença de rainha, ausência de abelhas adultas mortas e ausência de crias doentes. Nos últimos anos, os estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina também já relataram perdas de colônias (MESSAGE et al., 2011). Somente na região Sul do país, 30 a 40% das colônias já foram perdidas. Em Abril de 2012 apicultores de Florianópolis registraram perdas das colônias, no momento em que as operárias saíram para realizar a polinização (APACAME, 2016).

As causas para esse fenômeno ainda são discutidas e não se tem conclusões sobre o agente causador, pois vários fatores podem estar afetando o desaparecimento das abelhas. Um deles é o aparecimento do ácaro *Varroa destructor* nos EUA, pois este se alimenta da hemolinfa das abelhas, enfraquecendo a imunidade do hospedeiro e pode ser também vetor de alguns vírus, como exemplo, o vírus denominado de “deformador das asas” (*Deformed Wing Virus - DWV*) (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; WILLIAMS et al., 2010; GARCIA, 2014).

Outros fatores que podem estar associados à CCD são baixa variabilidade genética das rainhas, toxinas químicas presentes no ambiente, desmatamento, mudanças climáticas e o uso excessivo ou incorreto de produtos químicos para o controle de insetos-praga (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; KAPLAN, 2012; RUCKER; THURMAN, 2012).

Os produtos químicos, em especial os inseticidas neonicotinoides, são destacados como um dos principais fatores para o sumiço das abelhas, pois apresentam atividade enzimática, atuando no olfato destes insetos, podendo afetar o comportamento das abelhas e causar problemas no processo de polinização e captura de alimento, dificultando a localização das colônias (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012b; FREITAS; PINHEIRO, 2012; GONÇALVES, 2012).

Os inseticidas sintéticos vêm sendo utilizados de forma indiscriminada desde a Segunda Guerra Mundial, que primeiramente possuíam a função de proteger os soldados dos insetos vetores de doenças. Isso também ocorreu devido ao aumento no número de substâncias novas e o uso exacerbado na agricultura, pelo aumento no plantio de culturas e ao aparecimento de insetos-praga (SANCHES et al., 2003; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Os inseticidas podem afetar as abelhas por contato e ingestão e seus efeitos podem ser a morte causada por toxicidade, diminuição da longevidade e danos no funcionamento da colônia (MALASPINA et al., 2008).

Inseticidas sintéticos a base de tiametoxam, metidationa e abamectina por pulverização, contato e incorporação no alimento foram tóxicos para *A. mellifera*, reduzindo sua longevidade (CARVALHO et al., 2009). Em teste de alimentação, os inseticidas a base de abamectina, deltametrina, metamidofós e espinosade são tóxicos para *A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae), causando mortalidade destes insetos (SARTO, 2009).

Embora as causas da DCC ainda não sejam conclusivas, é possível apontar, pelos estudos realizados, que os inseticidas são prejudiciais às abelhas. Com isso são necessárias estratégias para tentar evitar ou diminuir o sumiço desses organismos. Para tentar minimizar ou evitar os efeitos da DCC têm-se possíveis alternativas, como: reflorestamento, recuperação e preservação de nascentes de água, além da conscientização do uso correto de inseticidas sintéticos associados a agentes de controle não danosos ao ambiente, que causem menor ou nenhum impacto ambiental (OLIVEIRA, 2015). Adicionalmente, um exemplo é o uso do controle biológico de pragas, que é considerado mais seguro ao ambiente, quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos (GALLO et al., 2002).

## 2.4 CONTROLE BIOLÓGICO COM ENTOMOPATÓGENOS

O controle biológico é um fenômeno natural com função de regular populações de insetos, através de seus inimigos naturais (GALLO et al., 2002). Este é considerado mais seguro ao ambiente, quando comparado ao controle químico, pois possui especificidade no controle de insetos-praga e preserva os inimigos naturais e demais organismos não-alvos que estão no ambiente. Outras vantagens da aplicação do controle biológico podem ser a garantia de alimentos mais saudáveis e ação de controle mais prolongada pelo estabelecimento da população de inimigos naturais no ambiente (ALVES, 1998; MELO; AZEVEDO, 2000).

O controle biológico pode ser realizado por entomófagos (parasitoides e predadores) e entomopatógenos (nematoides, fungos, vírus e bactérias) (PARRA et al., 2002). Dentre os entomopatógenos utilizados no controle microbiano, têm-se os fungos, que são causadores de doenças infecciosas nos insetos e possuem largo espectro de ação e as bactérias entomopatogênicas, que podem apresentar ação inseticida (ALVES, 1998). Os entomopatógenos apresentam capacidade de dispersão, quando comparados aos demais entomopatógenos (ALVES, 1998; GALLO et al., 2002).

#### 2.4.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são os micro-organismos causadores das doenças mais comuns entre os insetos em ecossistemas naturais (DALZOTO; UHRY, 2009). A forma de contaminação do inseto pelo fungo ocorre apenas em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição (ALVES, 1998). Dá-se através do contato, com isso os conídios do fungo penetram em qualquer parte da cutícula do inseto, formando um tubo germinativo e, em seguida, as hifas atravessam o tegumento. Posteriormente, o fungo multiplica-se no interior do inseto, apresentando massa hifal na hemocele, iniciando o processo de colonização (ALVES, 1998; LAZZARINI, 2005). Após 72/120 horas do contato, o inseto apresenta-se colonizado, assim o fungo emite hifas externamente, pelas articulações e outras aberturas naturais do inseto morto e esporula para iniciar outro ciclo de infecção. Os sintomas da doença podem aparecer como manchas escuras

pelo corpo do inseto, redução da alimentação, perda da coordenação motora, desorientação e, então, o inseto passa a ter uma coloração esbranquiçada (ALVES, 1998).

A vantagem da utilização de fungos entomopatogênicos é que a infecção ocorre via tegumento, já a infecção por outros patógenos ocorre, na maioria das vezes, apenas via oral. Outra vantagem é que os fungos são patógenos de largo espectro, podem atacar insetos aquáticos e fitófagos e podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos. Sua eficiência depende de fatores bióticos, que estão relacionados com o hospedeiro e patógenos, e fatores abióticos (ALVES, 1998). Dentre os principais fungos entomopatogênicos, destacam-se *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok, 1883.

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* é utilizado como agente de controle microbiano (ALVES, 1998), pois causa a doença branca nos insetos e no Brasil é utilizado para o controle de diversos ácaros e insetos-praga (AGROFIT, 2016), conforme visualizado no Quadro 2. Este tipo de controle pode ser uma alternativa para substituir a utilização de inseticidas químicos, pois sua dispersão natural possibilita a transmissão e redução natural da praga, podendo afetar as gerações futuras, pois pode manter-se no ambiente (ALVES, 1998).

Produto	Inseto e ácaros alvos	
	Nome Científico	Nome comum
Ballveria <sup>®</sup>	<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca-branca
BeauveControl <sup>®</sup>	<i>Bemisia tabaci</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Dalbulus maidis</i>	Mosca-branca Ácaro-rajado Cigarrinha-do-milho
Beauveria JCO <sup>®</sup>	<i>Cosmopolites sordidus</i> <i>Dalbulus maidis</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Bemisia tabaci</i>	Broca-do-rizoma Cigarrinha-do-milho Ácaro-rajado Mosca-branca
Bouveriz WP Biocontrol <sup>®</sup>	<i>Cosmopolites sordidus</i> <i>Dalbulus maidis</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Bemisia tabaci</i>	Broca-do-rizoma Cigarrinha-do-milho Ácaro-rajado Mosca-branca
Bovebio <sup>®</sup>	<i>Cosmopolites sordidus</i> <i>Dalbulus maidis</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Bemisia tabaci</i>	Broca-do-rizoma Cigarrinha-do-milho Ácaro-rajado Mosca-branca
Bovemax EC <sup>®</sup>	<i>Hypothenemus hampei</i> <i>Diaphorina citri</i>	Broca-do-café Psílideo
Boveril WP PL63 <sup>®</sup>	<i>Tetranychus urticae</i> <i>Hypothenemus hampei</i> <i>Gonipterus scutellatus</i>	Ácaro-rajado Broca-do-café Gorgulho-do-eucalipto
Granada <sup>®</sup>	<i>Cosmopolites sordidus</i> <i>Dalbulus maidis</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Bemisia tabaci</i>	Broca-do-rizoma Cigarrinha-do-milho Ácaro-rajado Mosca-branca

Quadro 2: Produtos registrados à base de *Beauveria bassiana* disponíveis no mercado e insetos e ácaros alvos (nome científico e nome comum).

Fonte: AGROFIT, 2016.

#### 2.4.2 Bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 pertence ao grupo das bactérias Gram Positivas e pode apresentar ação patogênica e potencial para o controle de insetos-praga, tem respiração aeróbia e formato de bastão. Pode ser encontrada em qualquer tipo de solo, pois tem capacidade de produzir cristais e esporos que podem ser tóxicos aos insetos e, devido a isso, é comumente utilizada na agricultura para o controle de insetos-praga (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2003).

O entomopatógeno *B. thuringiensis*, durante sua esporulação, sintetiza proteínas com atividade inseticida e o acúmulo dessas proteínas forma uma inclusão de cristais (POLANCZYK et al., 2003; POLANCZYK; ALVES, 2004). Em sua forma natural os cristais não possuem ação inseticida, mas no momento em que o inseto ingere *B. thuringiensis*, os cristais se solubilizam em pH alcalino, liberando pró-toxinas e em contato com proteinases se transformam em polipeptídeos tóxicos (ALVES, 1998; MELO; AZEVEDO, 2000; FIUZA, 2009). Estes polipeptídeos se ligam a receptores presentes na membrana das células do epitélio do inseto, causando perfurações. Na sequência, há um desequilíbrio osmótico e iônico, desintegrando as células e conseqüente morte do inseto por septicemia (MELO; AZEVEDO, 2000; POLANCZYK et al., 2003; FIUZA, 2009).

No Brasil estão disponíveis no mercado produtos registrados que são formulados a base da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (AGROFIT, 2016), conforme o Quadro 3.

(continua)

Produto	Inseto-praga	
	Nome Científico	Nome comum
Able <sup>®</sup>	<i>Diaphania nitidalis</i> <i>Helicoverpa</i> sp. <i>Ecdytolopha aurantiana</i> <i>Brassolis sophorae</i> <i>Asciamonus teorseis</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Tuta absoluta</i>	Broca-da-aboboreira Helicoverpa Bicho-furão Lagarta-das-palmeiras Curuquerê-da-couve Traça-das-crucíferas Lagarta-da-soja Traça-do-tomateiro
Able OF <sup>®</sup>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lagarta-do-algodão
Bac-Control EC <sup>®</sup>	<i>Helicoverpa</i> sp.	Helicoverpa
Bactur WP <sup>®</sup>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lagarta-da-soja
Ponto Final <sup>®</sup>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lagarta-do-algodão
Bac-Control WP <sup>®</sup>	<i>Diaphania nitidalis</i> <i>Diaphania hyalinata</i> <i>Helicoverp</i> asp. <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Plutella xylostella</i>	Broca-da-aboboreira Lagarta-rosca Helicoverpa Lagarta-da-soja Lagarta-do-cartucho Traça-das-crucíferas
BTControl <sup>®</sup>	<i>Helicoverp</i> asp. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	Helicoverpa Lagarta-da-soja
Dipel <sup>®</sup>	<i>Diaphania nitidalis</i> <i>Diaphania hyalinata</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Ecdytolopha aurantiana</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Pseudaletia sequax</i> <i>Opsiphane sinvirae</i>	Broca-da-aboboreira Lagarta-rosca Lagarta-da-soja Lagarta-do-algodão Bicho-furão Broca-da-cana Lagarta-do-trigo Lagarta-desfolhadora

(conclusão)

Dipel WG <sup>®</sup>	<i>Strymon basalides</i> <i>Alabama argillacea</i> <i>Helicoverpa sp.</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Ecdytolopha aurantiana</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Tuta absoluta</i> <i>Diaphania nitidalis</i> <i>Grapholita molesta</i>	Broca-do-abacaxi Curuquerê Helicoverpa Broca-da-cana Bicho-furão Traça-das-crucíferas Lagarta-da-soja Traça-do-tomateiro Broca-da-aboboreira Mariposa-oriental
Dipel WP <sup>®</sup>	<i>Strymon basalides</i> <i>Alabama argillacea</i> <i>Helicoverpa sp.</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Ecdytolopha aurantiana</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Tuta absoluta</i> <i>Diaphania nitidalis</i> <i>Grapholita molesta</i>	Broca do abacaxi Curuquerê Helicoverpa Broca-da-cana Bicho-furão Traça-das-crucíferas Traça-do-tomateiro Broca-da-aboboreira Mariposa-oriental
Thuricide <sup>®</sup>	<i>Anticarsia gemmatalis</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Plutella xylostella</i>	Lagarta-da-soja Lagarta-do-cartucho Traça-das-crucíferas
Agree <sup>®</sup>	<i>Plutella xylostella</i> <i>Tuta absoluta</i> <i>Diaphania nitidalis</i> <i>Diaphania hyalinata</i> <i>Neoleucino deselegantalis</i> <i>Ecdytolopha aurantiana</i>	Traça-das-crucíferas Traça-do-tomateiro Broca-da-aboboreira Lagarta-rosca Broca-pequena-do-fruto Bicho-furão
Xentari <sup>®</sup>	<i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Asciamonus teorseis</i> <i>Tuta absoluta</i>	Lagarta-do-cartucho Traça-das-crucíferas Curuquerê-da-couve Traça-do-tomateiro

Quadro 3: Produtos registrados à base de *Bacillus thuringiensis* disponíveis no mercado e insetos-praga controlados (nome científico e nome comum)

Fonte: AGROFIT, 2016.

Segundo Polanczyk et al. (2003), o emprego de produtos à base de *B. thuringiensis* é desejável para o controle de insetos devido à sua alta especificidade

e rápida degradação no ambiente. As vantagens da utilização são: produção em grande escala em meios com custo mais baixo, aplicação através equipamentos tradicionais, morte larval rápida e poucos efeitos em insetos e organismos não-alvos.

## 2.5 SELETIVIDADE DE ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVO DA ORDEM HYMENOPTERA

Os entomopatógenos possuem vantagens em relação ao seu uso, quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos, como: especificidade ao inseto-praga, multiplicação, dispersão e produção dos micro-organismos no ambiente. Podem também causar efeitos secundários, afetando as gerações futuras, diminuindo a oviposição e a viabilidade dos ovos dos insetos-praga, além da não poluição e toxicidade ao ambiente (ALVES, 1998).

Porém, são necessários estudos para avaliar possíveis efeitos a organismos não-alvos, como às abelhas *A. mellifera*, as quais apresentam relatos de desordem das colônias (CCD).

### 2.5.1 Fungos entomopatogênicos sobre organismos não-alvo da Ordem Hymenoptera

Os fungos entomopatogênicos são utilizados como uma alternativa para reduzir a utilização dos inseticidas químicos no controle de insetos-praga, porém a seletividade destes a organismos não-alvos deve ser constantemente avaliada. Alguns trabalhos já foram realizados a fim de verificar esta seletividade a insetos da ordem Hymenoptera.

Em um estudo de avaliação da seletividade de fungos entomopatogênicos ao parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Potrich et al. (2009) verificaram que quando pulverizado, *M. anisopliae* causa diminuição na emergência destes insetos, ocasionando mortalidade. No entanto, formulações comerciais à base de *B. bassiana* e *M.*

*anisopliae* testados por Polanczyk et al. (2010) não afetam a longevidade e nem causam mortalidade em adultos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

Em outros estudos, verificou-se que *B. bassiana*, na dosagem de  $10^5$  conídios.ml<sup>-1</sup>, causa mortalidade às operárias de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) através de contato direto e aplicação tópica deste fungo sobre o tórax das abelhas recém emergidas (CONCEIÇÃO et al., 2014).

São poucos os estudos realizados sobre as abelhas *A. mellifera* envolvendo a ação dos fungos entomopatogênicos comerciais. Entretanto, é necessário avaliar a seletividade destes, uma vez que novas formulações e isolados surgem constantemente no mercado e a segurança e seletividade às abelhas é considerada essencial, devido à sua importância nos ecossistemas.

Neste sentido, três isolados de *B. bassiana* foram testados para o controle do “percevejo-manchado” *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) e a seletividade destes a *A. mellifera*, através do contato em folhas de canola. O fungo foi eficaz no controle do percevejo, além de não causar mortalidade às abelhas (AL MAZRA’AWI et al., 2006).

Três isolados dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Clonostachys rosea* foram testados para controle do ácaro *Varroa destructor* e seletividade a *A. mellifera*, através da imersão do ácaro em uma solução de esporos, posteriormente este foi colocado em contato com as abelhas. Os fungos *B. bassiana* e *C. rosea* são eficazes no controle de *V. destructor*, porém causam mortalidade às abelhas. Apenas *M. anisopliae* provocou baixa mortalidade a *A. mellifera*, com controle eficaz do ácaro (HAMIDUZZAMAN et al., 2012).

O fungo *B. bassiana*, oriundo de produto comercial, reduziu a sobrevivência de *A. mellifera* nos experimentos por pulverização direta, entomopatógenos incorporados à dieta e contato com superfícies tratadas (folhas de soja e placas de petri). Entretanto não provocou alterações morfológicas ou morfométricas no mesêntero destas abelhas alimentadas com pasta Cândi incorporada com os agentes de controle (SILVA, 2014). Assim, verifica-se que são necessários novos estudos para verificar a seletividade do fungo entomopatogênico *B. bassiana* às abelhas *A. mellifera*.

### 2.5.2 *Bacillus thuringiensis* sobre organismos não-alvo da Ordem Hymenoptera

Assim como os fungos entomopatogênicos, as bactérias devem ser avaliadas quanto à seletividade a organismos não-alvos, por serem uma alternativa de redução da utilização de inseticidas sintéticos. Em estudos sobre organismos não-alvos, *Bacillus thuringiensis*, no teste de contato, não foi tóxico a *Scaptotrigona tubiba* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae) e provocou baixa mortalidade dos organismos, com média de três abelhas mortas, num total de 20 insetos. Porém o método de aplicação tópica de *B. thuringiensis* nos insetos apresentou toxicidade, causando mortalidade significativa, com média de nove abelhas mortas, dentre as 20 testadas (MORAES; BAUTISTA; VIANA, 2000).

*B. thuringiensis* também não afetou o parasitismo e a sobrevivência de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), porém alguns isolados desta bactéria afetaram a emergência deste parasitoide (PRATISSOLII et al., 2006). Esta mesma bactéria reduziu as porcentagens de parasitismo e emergência de *T. pretiosum* em ovos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), no teste de dieta contaminada com *B. thuringiensis*, porém não impossibilitou a obtenção da próxima geração (BORTOLI et al., 2012).

Os estudos sobre a seletividade de *B. thuringiensis* ainda são escassos a organismos não-alvos e organismos considerados úteis, como as abelhas *A. mellifera*. Dentre os estudos, através dos métodos de aplicação por pulverização, adição à pasta Cândi e fornecimento por solução aquosa de mel a 50%, *B. thuringiensis* provocou mortalidade em adultos de *A. mellifera* (BRIGHENTI et al., 2007).

Em outro estudo, Dai et al. (2012) verificaram que a toxina Cry1Ah, proveniente da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis*, não alterou a sobrevivência, longevidade, consumo de pólen e peso da glândula hipofaríngea de *A. mellifera ligustica* e *Apis cerana cerana*, quando adicionada em xarope de açúcar, em diferentes concentrações. Esta mesma bactéria não provocou alterações morfológicas ou morfométricas no mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com *B. thuringiensis* e não reduziu a longevidade das operárias

nos respectivos experimentos (pulverização direta, contato em folhas de soja e em placas de petri) (SILVA, 2014).

Os entomopatógenos são utilizados como estratégia para reduzir a utilização de inseticidas sintéticos para o controle de insetos-praga e são considerados mais seguros ao ambiente, pois não são tóxicos a outros animais e não poluem o meio. No entanto, é necessário avaliar se esses agentes de controle podem causar algum efeito negativo em abelhas *A. mellifera*, principais polinizadores e também fonte de renda para muitos agricultores.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico I e II, na Unidade de Ensino e Pesquisa Apicultura (UNEPE-APICULTURA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ENTOMOPATÓGENOS

Os entomopatógenos estão formulados nos produtos comerciais: Produto A (Cepa PL63), a base do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* ( $5,0 \times 10^{11}$  conídios viáveis.kg<sup>-1</sup>); Produto B, com formulação a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-I, na ( $2,5 \times 10^9$  esporos viáveis.g<sup>-1</sup>), na concentração recomendada pelo fabricante para *Anticarsia gemmatalis* (inseto-praga da cultura da soja) e Produto C, com formulação a base da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis aizawai* GC-91 ( $1,0 \times 10^9$  esporos viáveis.g<sup>-1</sup>), na concentração recomendada pelo fabricante para *Anticarsia gemmatalis* (inseto-praga da cultura da soja), conforme visualizado no Quadro 4.

Tratamentos	Concentração
Água destilada esterilizada	-
Água destilada esterilizada com Tween <sup>®</sup> 80	10 µL/1000 mL de água destilada esterilizada
<i>Beauveria bassiana</i> (Produto A)	1 g do produto/100 mL de água destilada esterilizada com Tween <sup>®</sup> 80 (0,01%)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Produto B)	0,5 g do produto/100 mL de água destilada esterilizada
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Produto C)	0,5 g do produto/100 mL de água destilada esterilizada

**Quadro 4: Tratamentos e concentrações utilizados para a realização dos experimentos.**  
**Fonte: A autoria própria, 2016.**

### 3.2 OBTENÇÃO DAS ABELHAS *Apis mellifera*

As operárias de *A. mellifera* foram obtidas a partir de seis favos tipo Langstroth de cria operculada, provenientes do Apiário Experimental da UNEPE Apicultura da UTFPR-DV. Os favos foram alocados em colmeias escolhidas a partir da qualidade e quantidade de oviposição da rainha e foi fornecido diariamente dieta artificial (proteína isolada da soja, óleo de linhaça, óleo de palma, levedo de cerveja, açúcar, mel, pólen, lecitina de soja e núcleo de vitaminas) até o momento do início da oviposição. Quando foi observada a presença de ovos de um dia, a alimentação ocorreu três vezes por semana e iniciou-se a contagem até o 21º dia (comumente é o momento em que as operárias emergem) (COUTO; COUTO, 2002). No 19º dia os favos foram retirados do apiário, acondicionados em sacos de papel Kraft (60 cm x 70 cm com gramatura 50 mm), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico II (Figura 1). Os favos foram alocados em câmara climatizada tipo B.O.D (30 ± 2°C, U.R de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas) para simular o ambiente da colmeia de origem, até sua emergência, obtendo-se operárias de idade padronizada.



**Figura 1: Favo tipo Langstroth de cria operculada para criação de *A. mellifera*, disponível na UNEPE Apicultura da UTFPR.  
Fonte: SIMIONATTO, 2013.**

### 3.3 BIOENSAIO: EFEITO DOS ENTOMOPATÓGENOS INCORPORADOS À PASTA CÂNDI, SOBRE OPERÁRIAS DE *A. mellifera*

Operárias de *A. mellifera* recém emergidas foram transferidas, individualmente, para tubos de vidro de fundo chato (10 cm de altura x 2,5 cm Ø) esterilizados, sendo posteriormente cobertos com tecido *voil*. Sobre o tecido foi adicionado algodão embebido em 2 mL de água destilada esterilizada e 5 g de pasta Cândi (açúcar de confeitado e mel) incorporada com os tratamentos (Figura 2A e 2B). Os tratamentos foram: Água destilada esterilizada, Água destilada esterilizada com Tween 80<sup>®</sup> (0,01%), *B. bassiana* (Produto A), *B. thuringiensis* (Produto B) e *B. thuringiensis* (Produto C) (Quadro 4). Para a solução de Tween 80<sup>®</sup> (0,01%), foi adicionado 10 µL do produto em 1000 mL de água destilada esterilizada.

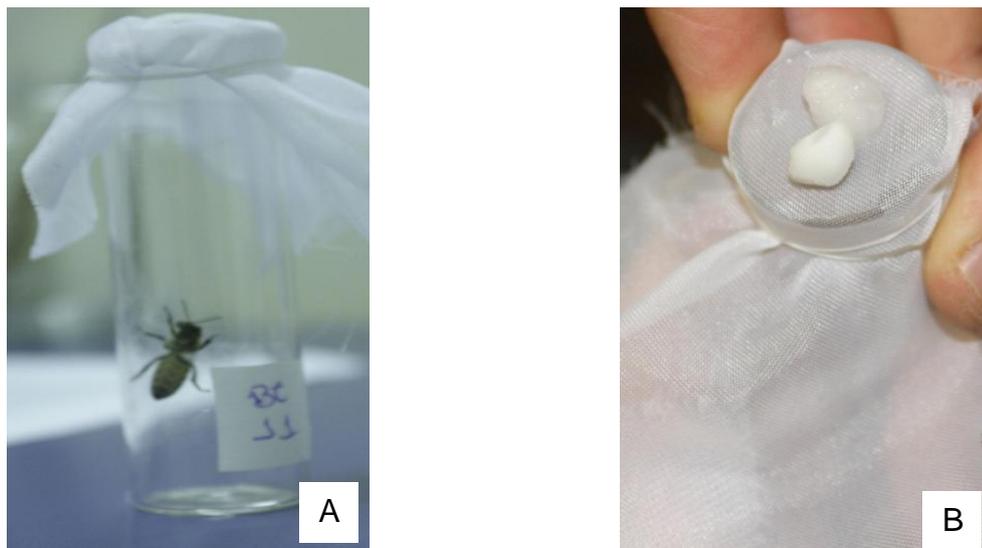


Figura 2: A) Tubo de fundo chato, contendo uma operária de *A. mellifera*, coberto com tecido *voil*; B) Algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi incorporada com os tratamentos.

Fonte: A autoria própria, 2016.

Para a preparação da solução contendo o fungo *B. bassiana* foi dissolvido 1g do produto em 100 mL de água destilada esterilizada, contendo Tween 80<sup>®</sup> (0,01%). A solução contendo a bactéria *B. thuringiensis* foi realizada misturando 0,50 g do pó em 100 mL de água destilada esterilizada.

Para todos os tratamentos foram adicionados 2 mL das soluções testemunha ou entomopatógenos, em 100 g de pasta Cândi (100 g de açúcar de confeito e 20 mL de mel) para fornecer às operárias. Cada tratamento foi constituído por 80 repetições, sendo cada tubo de vidro, contendo uma operária, considerado uma repetição. Os tubos contendo as operárias foram acondicionados em câmara climatizada tipo B.O.D (30 ± 2°C, U.R de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas) (Figura 3). A longevidade das operárias foi avaliada a cada seis horas, durante 10 dias.

Para o bioensaio com entomopatógenos incorporados à pasta Cândi foi realizada análise de variância ANOVA e posteriormente as médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 95% de credibilidade, no programa Assistat Versão 7.7 Beta<sup>®</sup> (SILVA, 2014).



**Figura 3: Acondicionamento dos tubos de fundo chato em estufa tipo B.O.D. contendo as operárias de *A. mellifera*.**

Fonte: Autoria própria, 2016.

### 3.4 ANÁLISE DO MESÊNTERO DE OPERÁRIAS DE *A. mellifera* UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Logo após a verificação da mortalidade das abelhas, foram separadas e selecionadas, aleatoriamente, duas abelhas por tratamento para a dissecação e retirada do mesêntero, com auxílio de pinça metálica, lâmina de bisturi e Microscópio

Estereoscópico Binocular A.cietifica/Edutec (modelo: 505A/80XB). No momento da dissecação os mesênteros receberam 1 mL de Fixador Karnovsky modificado [Paraformaldeído 3%, Glutaraldeído 3% e Tampão Fosfato ( $\text{PO}_4$  0,1M)] para preservá-los da possível decomposição. As amostras do mesêntero foram fixadas em Fixador Karnovsky modificado *overnight* e acondicionadas em geladeira ( $4^\circ\text{C}$ ) do Laboratório de Controle Biológico II (Figura 4A e 4B).

Posteriormente as amostras foram levadas ao LMEM/UEL para lavagem em tampão fosfato (3x15 minutos), fixação em solução de Tetróxido de Ósmio 1% ( $\text{OsO}_4$ ) por 1 hora e, então, realizada nova lavagem em tampão fosfato (3x15 minutos) (Figura 4C e 4D). O material foi então desidratado em bateria de álcool (álcool 70%: 3x10 minutos, álcool 80%: 3x10 minutos, álcool 90%: 3x10 minutos e álcool 100%: 4x10 minutos) e  $\text{CO}_2$  em Ponto Crítico BAL – TEC (modelo CPD 030) (Figura 5A).



**Figura 4:** A) Dissecação e retirada do mesêntero das operárias de *A. mellifera*; B) Amostras dos mesênteros acondicionadas em fixador Karnovsky, em tubos eppendorf; C) Lavagem dos mesênteros em tampão fosfato; D) Fixação dos mesênteros em solução de tetróxido de ósmio 1%.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Após a desidratação, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) contendo cola de prata, com auxílio de Microscópio Estereoscópico, marca LEICA modelo MZ6 e pinça de metal. Os *stubs* com as amostras foram recobertos com ouro, através do equipamento Metalizador BAL-TEC (modelo SCD – 050) (Figura 5B e 5C) e então observadas em alto vácuo de intensidade de feixe de elétrons, em Microscópio Eletrônico de Varredura, e as imagens foram capturadas por meio de fotos digitais, armazenadas em computador (Figura 5D).

Por meio das imagens foi realizada análise qualitativa, a fim de verificar a presença ou não dos entomopatógenos nas amostras, comparando com as amostras oriundas da testemunha.

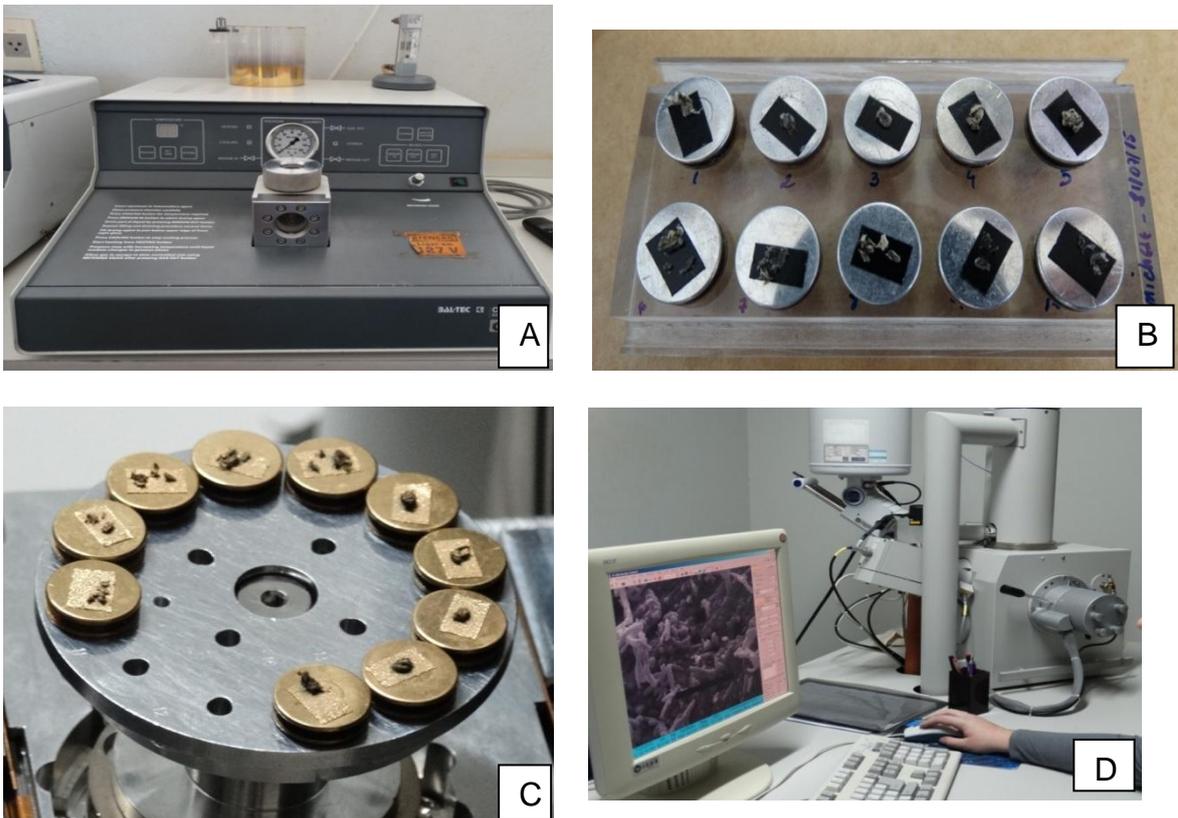


Figura 5: A) Desidratação das amostras de mesêntero com CO<sub>2</sub> em Ponto Crítico BAL-TEC (modelo CPD 030); B Amostras de mesêntero montadas em suporte metálico (*stubs*) contendo cola de prata; C) Metalização das amostras em Metalizador BAL-TEC (modelo SCD-050); D) Análise das amostras em Microscópio Eletrônico de Varredura, em alto vácuo de intensidade de feixe de elétrons.

Fonte: Autorial própria, 2015.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 BIOENSAIO: EFEITO DOS ENTOMOPATÓGENOS INCORPORADOS À PASTA CÂNDI, SOBRE OPERÁRIAS DE *A. mellifera*

Os produtos comerciais formulados à base de *B. thuringiensis* (produtos B e C) reduziram a longevidade das operárias de *A. mellifera* (64,12 e 62,47 horas, respectivamente) quando comparados às testemunhas T1 e T2 (72,97 e 80,77 horas, respectivamente) (Tabela 1).

**Tabela 1. Longevidade (em horas) de operárias de *Apis mellifera* após fornecimento de pasta Cândi incorporada com os entomopatógenos. Temperatura  $30 \pm 2$  °C, 12 horas de fotofase e U.R. de  $70 \pm 10\%$ . UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.**

Tratamento	Longevidade (horas)	Longevidade (dias)
T1 (Água)	72,97 $\pm$ 3,79 a	3,04
T2 (Água + Tween <sup>®</sup> 0,01%)	80,77 $\pm$ 3,60 a	3,36
<i>B. bassiana</i> (Produto A)	60,45 $\pm$ 4,02 b	2,51
<i>B. thuringiensis</i> (Produto B)	64,12 $\pm$ 3,99 b	2,67
<i>B. thuringiensis</i> (Produto C)	62,47 $\pm$ 3,85 b	2,60
p valor	< 0,01	

Fonte: Autoria própria, 2016.

Verificou-se, em outros trabalhos, que a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* reduz a sobrevivência de operárias de *A. mellifera*, quando incorporada à pasta Cândi (10 e 20g do produto/60g de pasta Cândi), provocando mortalidade de 100% das operárias, 72 horas após a ingestão (BRIGHENTI et al., 2007). Neste mesmo experimento, os autores verificaram que a longevidade média das abelhas foi entre 2,6 a 3,1, dias quando submetidas às concentrações de *B. thuringiensis* utilizadas (0,25, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 10,0 e 20,0g).

Em outro trabalho, o produto comercial formulado à base de *B. thuringiensis*, incorporado à dieta (0,03 g do produto/60g de pasta Cândi), causou redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* (131,3 horas), quando comparado à testemunha (169,8 horas) (SILVA, 2014).

No presente trabalho os dois produtos comerciais formulados à base da bactéria *B. thuringiensis* causaram redução na longevidade das operárias, após estas ingerirem pasta Cândi incorporada com o entomopatógeno. Estas operárias apresentaram longevidade média de 64,12 horas (2,67 dias) e 62,47 horas (2,60 dias) (Produto B e C, respectivamente), resultado semelhante aos encontrados por Brighenti et al. (2007) e Silva (2014).

Possivelmente os resultados obtidos neste trabalho estejam relacionados ao modo de ação do agente de controle *B. thuringiensis*. Ao ingerir os esporos da bactéria, estes entram em contato com o trato digestivo do inseto, que possui pH alcalino (GALLO et al., 2002) e, assim, os cristais se solubilizam e liberam prótoxinas, que em contato com proteases das células, se transformam em  $\delta$ -endotoxinas (ALVES, 1998; FIUZA, 2009). Após, os cristais se ligam a receptores presentes na membrana das células do epitélio do inseto, causando perfurações e então o desequilíbrio osmótico e iônico, desintegrando as células e levando o inseto à morte por septicemia (ALVES, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2004; FIUZA, 2009).

Apesar dessa ser uma hipótese válida, comumente observa-se a ação de *B. thuringiensis* em menos de 48 horas sobre outros insetos, como em lepidópteros (PESSOA, 2011), o que seria mais rápido do que observado no presente trabalho.

Simionatto (2013) verificou que ao fornecer o produto comercial formulado à base de *B. thuringiensis*, incorporado na pasta Cândi, na concentração de 0,3g/100 mL de água, este não interferiu na longevidade das operárias de *A. mellifera* (100,10 horas), quando comparado à testemunha (80,20 horas). Dai et al. (2012) também verificaram que a toxina Cry1Ah, proveniente de *B. thuringiensis*, não alterou a sobrevivência, longevidade, consumo de pólen e peso da glândula hipofaríngea de *A. mellifera ligustica* e *Apis cerana cerana*, quando adicionado em xarope de açúcar, em diferentes concentrações.

Com relação ao fungo, no presente trabalho, o produto comercial formulado à base de *B. bassiana* também reduziu a longevidade das operárias de *A. mellifera* (60,45 horas), quando comparado às testemunhas T1 e T2 (72,97 e 80,77 horas, respectivamente). Efeito semelhante foi observado em outros trabalhos, em que o produto comercial formulado à base de *B. bassiana* ingerido por meio de pasta Cândi tratada, reduziu a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* (SILVA, 2014). Hamiduzzaman et al. (2012) também verificaram que o isolado GHA do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, quando testado para o controle de *V. destructor* e

seletividade a *A. mellifera*, em experimento de imersão do ácaro em solução de esporos, causou 40,83% de redução na emergência das abelhas e mortalidade em 59,17%, quando estas entraram em contato com o ácaro contaminado com o fungo.

Por outro lado, os isolados de *B. bassiana*, ARSEF 3769 (ARK), NY (NY; BB008, SCPFRC e GHA, quando testados pelo método de contato na superfície de folhas de canola (*Brassica napus* L.), não provocaram mortalidade nas operárias de *A. mellifera* e não foram observados insetos infectados pelo fungo (AL MAZRA'AWI et al., 2006). Outros parâmetros biológicos de *A. mellifera* foram avaliados quando em contato com *B. bassiana*, nos quais Meikle et al. (2007) verificaram que *B. bassiana* não teve efeito sobre o peso da colônia, peso das abelhas adultas e na produção de mel.

A redução da longevidade das operárias de *A. mellifera* após ingestão da dieta incorporada com *B. bassiana* pode estar relacionada ao seu modo de infecção, que é por contato. As operárias, ao se alimentarem da pasta Cândi, podem ter entrado em contato com conídios do fungo, que ao penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto, forma um tubo germinativo e, em seguida, as hifas atravessam o tegumento. Posteriormente, o fungo multiplica-se no interior do inseto, apresentando massa hifal na hemocele, iniciando o processo de colonização (ALVES, 1998; LAZZARINI, 2005).

O processo de germinação pode ocorrer de 12 a 18 horas e a penetração dos conídios no tegumento leva, aproximadamente, 12 horas. Após 30 horas do contato, o fungo começa a produzir e liberar substâncias tóxicas, que podem causar estresse ou levar o inseto a morte e 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado, ocorrendo a morte do mesmo pela falta de nutrientes e pelo acúmulo de substâncias tóxicas (ALVES, 1998). Essa pode ter sido a causa da redução da longevidade das operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com *B. bassiana* no presente trabalho, como observado na Tabela 1.

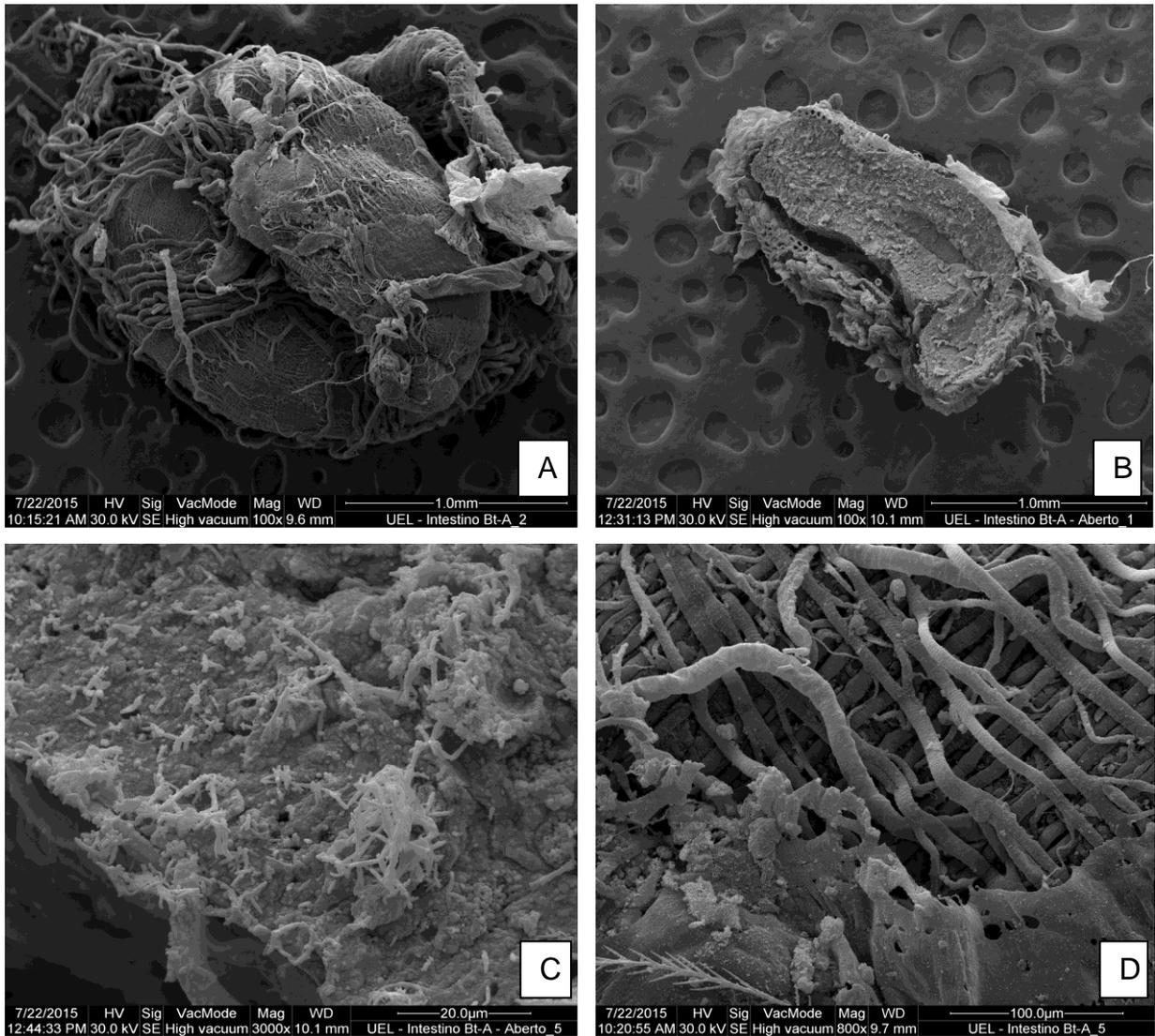
## 4.2 ANÁLISE DO MESÊNTERO DE OPERÁRIAS DE *A. mellifera* UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após a análise qualitativa das imagens, foi possível observar que o entomopatógeno *B. thuringiensis* não causou alterações morfológicas externas e internas nos tecidos do mesêntero de operárias de *A. mellifera* e não estava presente nas amostras analisadas, apesar de diminuir a longevidade das abelhas. Observou-se também a integridade do mesêntero, sem sinal de ruptura ou danos decorrentes do efeito dos produtos B (Figura 6A, 6B, 6C e 6D) e C (Figura 7A, 7B, 7C e 7D), quando comparado com as testemunhas T1 (Figura 8A, 8B, 8C e 8D) e T2 (Figura 9A, 9B, 9C e 9D).

Operárias de *A. mellifera*, quando alimentadas com pasta Cândi incorporada com *B. thuringiensis*, não apresentaram alterações no comprimento e na estrutura morfológica das vilosidades do mesêntero, comparadas às vilosidades das abelhas alimentadas com a solução testemunha das amostras analisadas em microscopia óptica (SIMIONATTO, 2013). Após fornecer dieta incorporada com produto comercial formulado à base *B. thuringiensis*, Silva (2014) também verificou que não houve alterações morfológicas e morfométricas no mesêntero das operárias de *A. mellifera*.

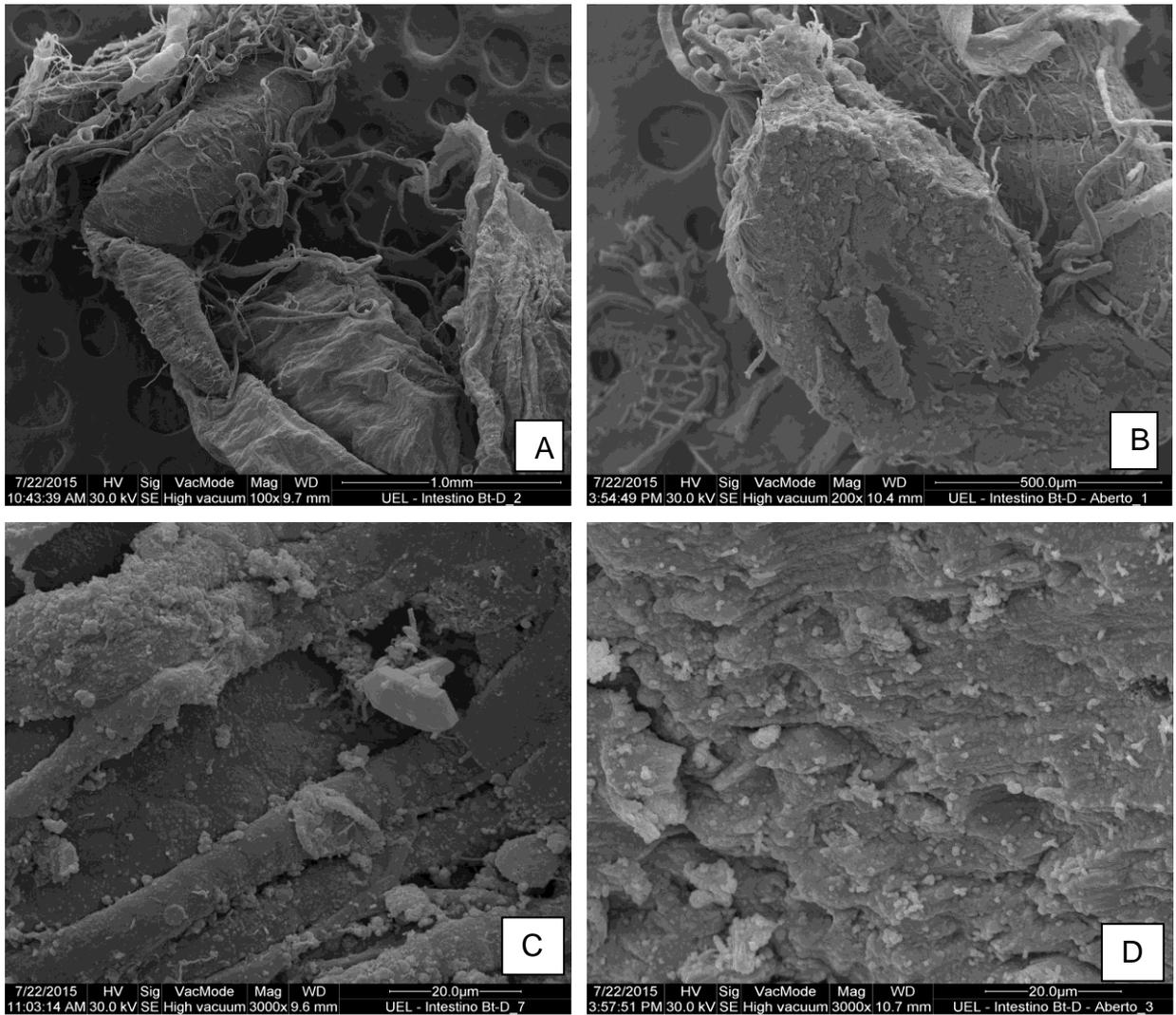
As proteínas cry1C e cry2C de *B. thuringiensis* em dieta artificial (geleia real, glicose, frutose, água destilada e extrato de levedura) fornecida à larvas de *A. mellifera*, não provocaram danos na borda do mesêntero deste inseto, quando análise realizada em microscopia óptica (WANG et al., 2015).

*Bacillus thuringiensis*, nas concentrações denominadas de campo (100,0 g/hL), baixa concentração (40,00 g/hL) e alta concentração (24.000,00 g/hL) provocou irregularidades no epitélio do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após 96 horas, sendo que nas duas maiores concentrações essas alterações foram verificadas após as primeiras 24 horas, em análise realizada por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (D'URSO et al., 2016).



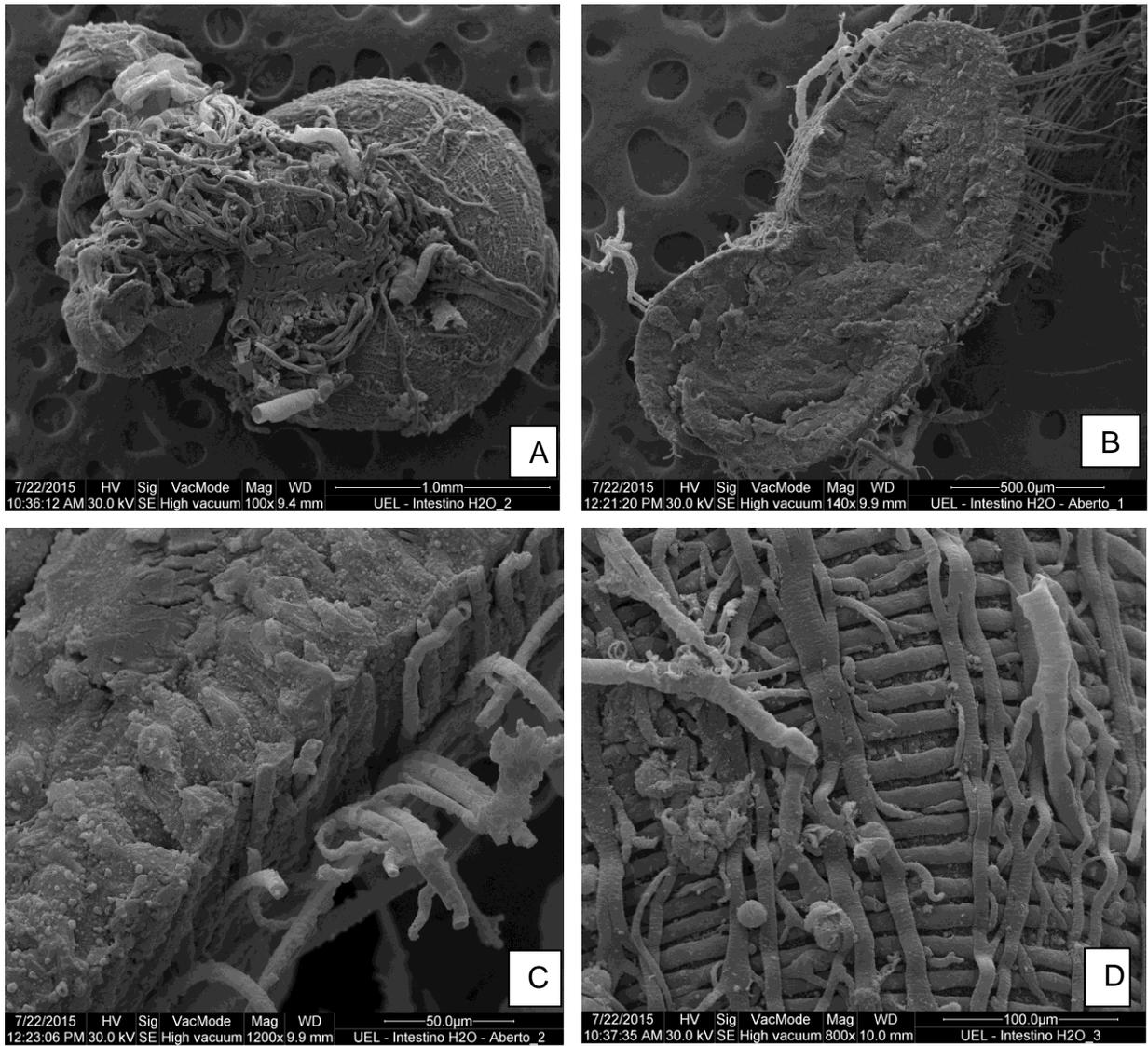
**Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com *B. thuringiensis*, produto B. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Aumento de 3000x do mesêntero; D) Traquéias do mesêntero.**

**Fonte: Autoria própria, 2015.**



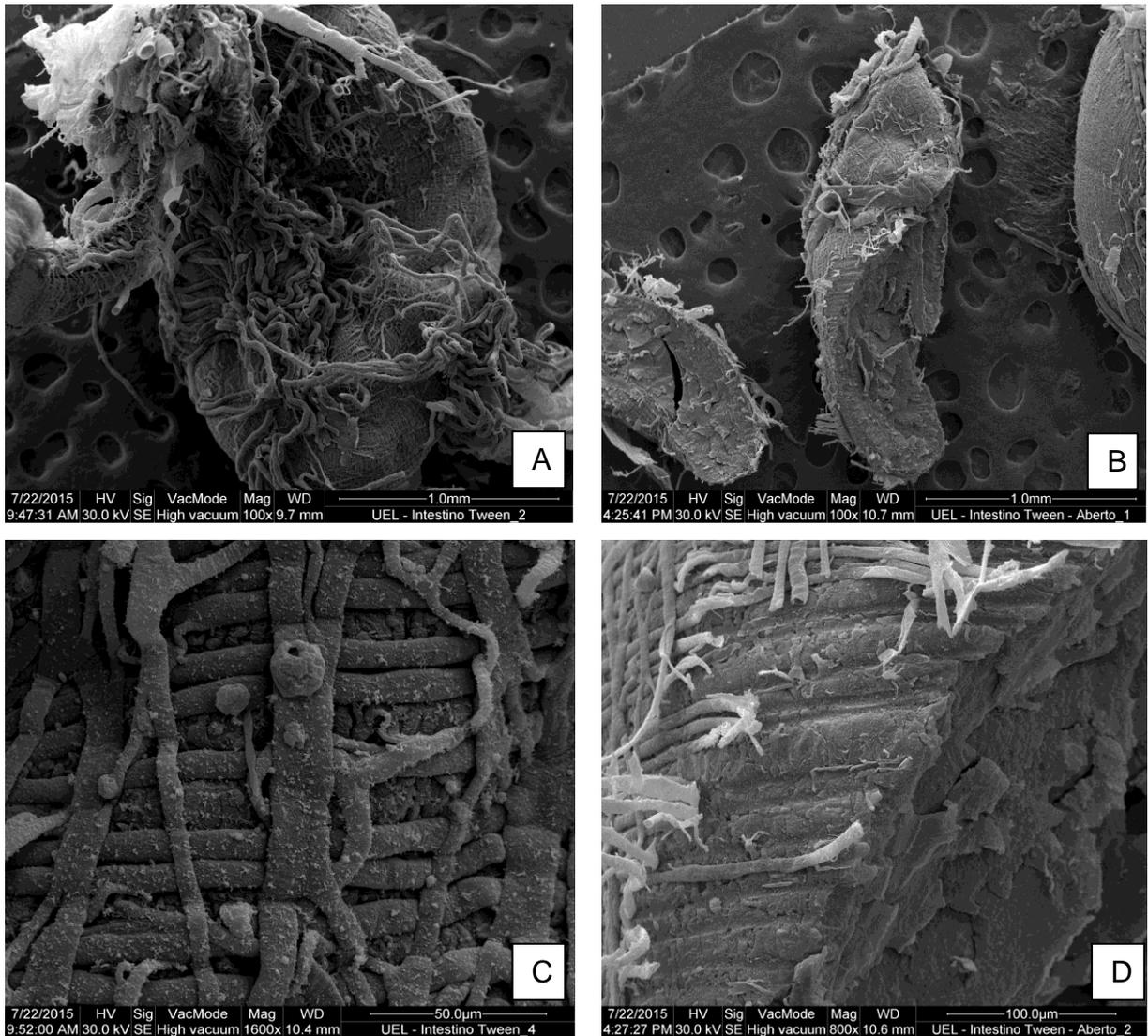
**Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com *B. thuringiensis*, produto C. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traquéias do mesêntero; D) Aumento de 3000x do mesêntero.**

**Fonte: Autoria própria, 2015.**



**Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com a testemunha água, T1. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Aumento de 1200 x do mesêntero; D) Traqueias do mesêntero.**

**Fonte: Autoria própria, 2015.**



**Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com a testemunha água com Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%), T2. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traqueias do mesêntero; D) Aumento de 800x do mesêntero.**

**Fonte: Autoria própria, 2015.**

No presente trabalho, possivelmente as operárias que ingeriram a dieta incorporada com o entomopatógeno *B. thuringiensis* ingeriram os esporos contendo os cristais da bactéria, mas possivelmente as toxinas não tenham sido ativadas pelo pH do trato digestório das operárias de *A. mellifera*, pois as proteases, que tornam os cristais da bactéria tóxicos, possuem diferentes condições de atuação e podem variar nas espécies de insetos, em função do hábito alimentar, tipo de dieta e condições físico-químicas da luz do intestino (ALVES, 1998). Quando as operárias de *A. mellifera* são alimentadas artificialmente com mel e açúcar, como no presente

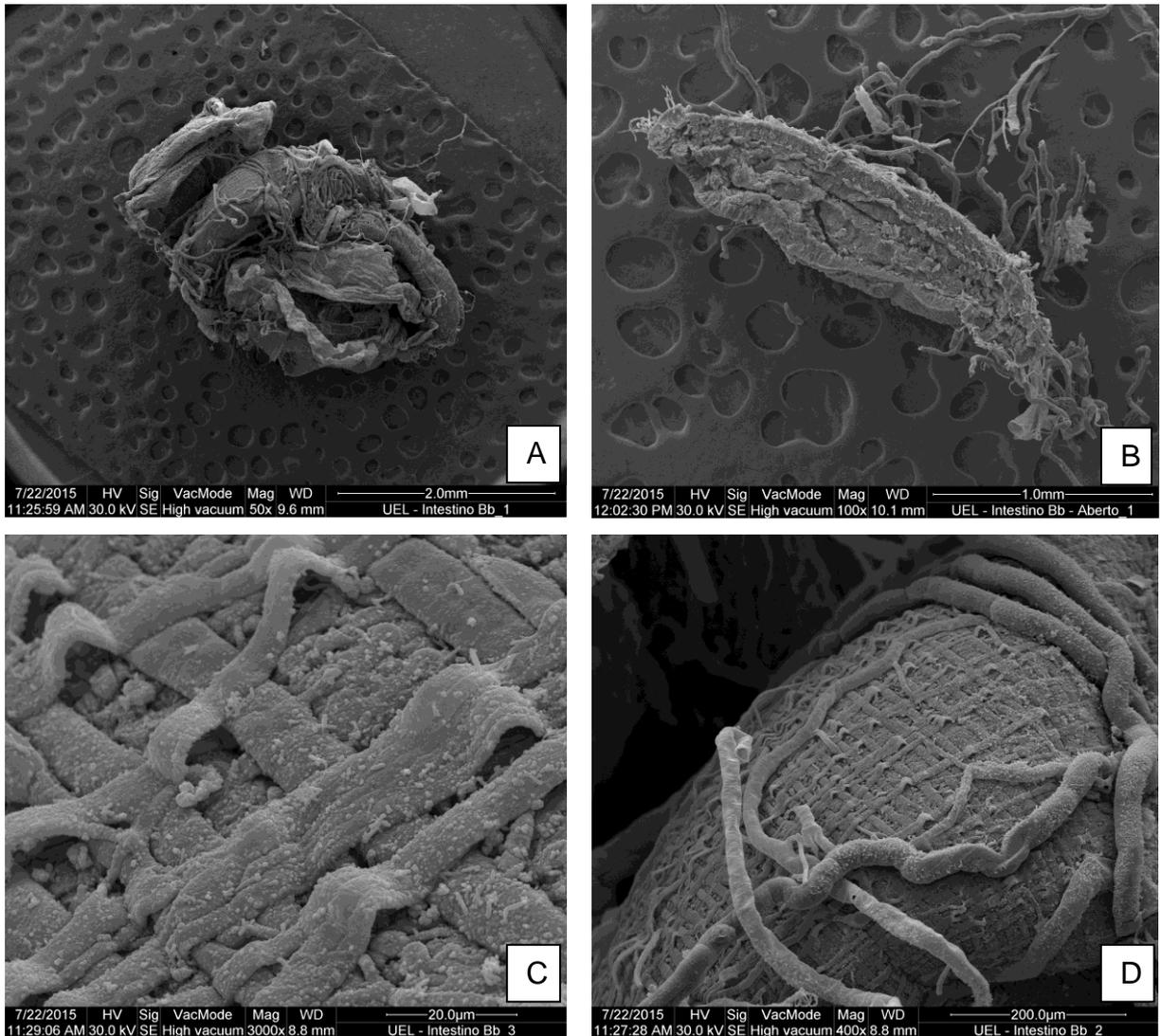
trabalho, o pH do trato digestório tende a diminuir, pois o mel possui pH baixo, acidificando o pH do mesêntero das abelhas (JACK, 2015).

Após a análise qualitativa das imagens, foi possível observar que o fungo entomopatogênico *B. bassiana*, não causou alterações morfológicas externas e internas nos tecidos do mesêntero de operárias de *A. mellifera* e não estava presente nas amostras analisadas (Figura 10A, 10B, 10C e 10D). Observou-se também a integridade dos mesênteros, sem sinal de ruptura ou danos decorrentes do efeito do produto, apesar de diminuir a longevidade das operárias de *A. mellifera*, conforme observado na Tabela 1.

Após fornecimento de dieta incorporada com produto comercial formulado à base de *B. bassiana*, Silva (2014) concluiu que não houve alterações morfológicas ou morfométricas no mesêntero das operárias de *A. mellifera*, quando analisadas em microscopia óptica.

No presente trabalho, possivelmente as operárias que ingeriram a pasta Cândi incorporada com *B. bassiana* ingeriram os conídios do fungo, porém esses podem não ter penetrado na cutícula do inseto, impedindo a colonização, ou penetraram em partes anteriores ao mesêntero, como aparelho bucal ou intestino anterior, pois não verificou-se conídios e hifas nas amostras de mesêntero analisadas, o que pode ser verificado na Figura 12. O resultado pode ser explicado pelo modo de infecção de *B. bassiana*, que age apenas quando o inseto entra em contato com os conídios do fungo, penetrando via cutícula, colonizando o inseto, o levando a morte (ALVES, 1998; LAZZARINI, 2005). Apesar de não estar presente nas amostras de mesêntero analisadas, o fungo *B. bassiana* reduziu a longevidade das operárias de *A. mellifera*, provavelmente pela produção de toxinas, como a Beauvericina (ALVES, 1998), que podem ter causado estresse nas abelhas, reduzindo sua longevidade.

Em todas as amostras de mesêntero analisadas, é possível observar a presença de outros micro-organismos, provavelmente estes são do próprio trato digestório do inseto ou também podem ser micro-organismos decompositores, devido a morte das abelhas.



**Figura 10: Fotomicrografia eletrônica de varredura do mesêntero de operárias de *A. mellifera*, após ingestão de pasta Cândi incorporada com *B. bassiana*. A) Vista total do mesêntero; B) Mesêntero com corte longitudinal; C) Traqueias do mesêntero; D) Traqueias do mesêntero.**

Fonte: Autoria própria, 2015.

O método e o momento em que são aplicados os entomopatógenos a campo podem fazer com que as abelhas entrem em contato com esses produtos, porém em quantidades menores. Assim, aplicações nos horários em que a taxa de forrageamento é menor, como no final da tarde, pode diminuir o contato das abelhas com os produtos. Outra alternativa para que as operárias não entrem em contato com os entomopatógenos é fechar a colmeia durante o período de aplicação, realizando a alimentação artificial durante esse período ou levar as colmeias para locais com distância de 2,5 km, no mínimo, do local onde serão realizadas as aplicações dos produtos.

Assim, novos estudos como diferentes métodos de aplicação são necessários a fim de verificar o efeito dos entomopatógenos testados no presente trabalho, como testes de pulverização e por contato a *A. mellifera* e principalmente testes a campo, para que possam ser utilizados sem causar efeitos negativos às abelhas, devido sua importância social, econômica e ambiental.

## 5 CONCLUSÃO

Os entomopatógenos *B. bassiana* e *B. thuringiensis*, nas formulações testadas, causaram redução na longevidade de operárias de *A. mellifera*, quando incorporados à dieta (pasta Cândia).

Apesar da redução na longevidade, observou-se a integridade do mesêntero, sem danos ou rupturas causados pelos entomopatógenos comerciais e também não foi verificada a presença de *B. bassiana* e/ou *B. thuringiensis* nas amostras analisadas.

## REFERÊNCIAS

AL-MAZRA'AWI, Mohammad S.; SHIPP, Les J.; BROADBENT, Bruce A.; KEVAN, Peter G. Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. **Environmental Entomology**, Annapolis, MD, v. 35, n. 6, p. 1569-1577, dez. 2006.

ALVES, Sérgio B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL – ABEMEL. **Setor Apícola Brasileiro em Números**. Dez. 2015. Disponível em: <[http://brazilletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_dezembro\\_2015.pdf](http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_dezembro_2015.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2016.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DOS APICULTORES CRIADORES DE ABELHAS MELÍFICAS EUROPÉIAS – **APACAME**. Mar. 2016. Disponível em: <<http://apacame.org.br/site/>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

BORTOLI, Sergio A.; VACARI, Alessandra M.; MAGALHÃES, Gustavo Oliveira de; DIBELLI, Wanderlei; BORTOLI, Caroline P. de.; ALVES, Murilo P. Subdosagens de *Bacillus thuringiensis* em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 50-55, mar./jun. 2012.

BRAIBANTE, Mara E. F.; ZAPPE, Janessa A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 10-15, fev. 2012.

BRIGHENTI, Deodoro M.; CARVALHO, César F.; CARVALHO, Geraldo A.; BRIGHENTI, Carla R.; CARVALHO, Stephan M. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 279-289, mar./abr. 2007.

CARVALHO, Stephan M.; CARVALHO, Geraldo A.; CARVALHO, César F.; BUENO FILHO, Julio S. de S. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, out./dez. 2009.

CONCEIÇÃO, Pamela de J.; NEVES, Cynthia M.; SODRÉ, Geni da S.; CARVALHO, Alfredo L. de.; SOUZA, Adriane V.; RIBEIRO, Generosa S.; PEREIRA, Rozimar. Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker

bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 61, n. 2, p. 184-188, jun. 2014.

COSTA-MAIA, Fabiana M.; LINO-LOURENÇO, Daniela A.; TOLEDO, Vagner de Alencar A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. Sistemas de produção agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Floresta), **Editora UTFPR**, Dois Vizinhos, v. 1, n. 1, p. 45-67, 2010.

COUTO, Regina H. N.; COUTO, Leomam A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002.

CRUZ-LANDIM, Carminda da; **Abelhas: morfologia e função dos sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

D'URSO, Vera; MAZZEO, Gaetana; VACCALLUZZO, Valerio; SABELLA, Giorgio; BUCCHIERI, Fabio; VISCUSO, Renata; VITALE, Danilo G. M. Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea) under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. **Apidologie**, Springer-Verlag, França, v. 47, p. 1-12, abr. 2016.

DAI, Ping-Li; ZHOU, Wei; ZHANG, Jie; JIANG, Wei-Yu; WANG, Qiang; CUI, Hong-Juan; SUN, Ji-Hu; WU, Yan-Yan; ZHOU, Ting. The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). **Apidologie**, Londres, v. 43, n. 4, p. 384-391, jul. 2012.

DALZOTO, Patrícia R.; UHRY, Kaline F. Controle Biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 37-41, jan./jun. 2009.

FIUZA, Lidia M. Mecanismo de Ação de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, n. 38, p. 32-25, 2009.

FREITAS, Breno M.; PINHEIRO, José N. **Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2012.

FRIES, Ingemar; CAMAZINE, Scott. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. **Apidologie**, Londres, v. 32, n. 3, p. 199-214, mai./jun. 2001.

GALLO, Domingos (*in memoriam*); NAKANO, Otavio; NETO, Silval S.; CARVALHO, Ricardo P. L.; BAPTISTA, Gilberto C. de.; FILHO, Evoneo B.; PARRA, José R. P.; ZUCCHI, Roberto A.; ALVES, Sérgio B.; VENDRAMIM, José D.; MARCHINI, Luis C.; LOPES, João R. S.; OMOTO, Celso. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 2002.

GARCIA, Fernanda W. **Identificação de vírus que afetam *Apis mellifera* associados ao ácaro ectoparasita *Varroa destructor* em apiários do Rio Grande do Sul**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul. 2014.

GONÇALVES, Lionel S. Consequências do desaparecimento (CCD) das abelhas no agronegócio apícola Internacional e em especial no Brasil. In: X Encontro sobre abelhas, 2012, Ribeirão Preto. **Anais do X Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, 2012, p. 24-25.

GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2009.

HAMIDUZZAMAN, Mollah M.; SINIA, Alice; GUZMAN-NOVOA, Ernesto; GOODWIN, Paul H. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 111, n. 3, p. 237-243, nov. 2012.

HORIZONTE GEOGRÁFICO. **A importância dos polinizadores na agricultura**. São Paulo, n. 159, mar./abr. 2016. (Edição Especial)

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L.; CANHOS, Dora A. Lange; ALVES, Denise de Araújo; SARAIVA, Antônio M. **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012a.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L.; GONÇALVES, Lionel S.; FRANCOY, Tiago M.; NUNES-SILVA, Patrícia. O Desaparecimento das Abelhas Melíferas (*Apis mellifera*) e as Perspectivas do Uso de Abelhas Não Melíferas na Polinização. **Embrapa Semi-Árido**, Petrolina, v. 249, p. 220-233, 2012b.

JACK, Cameron. **Colony Level Infection of Honey Bee Gut Pathogen, *Nosema ceranae* and Role of Pollen Nutrition in *Nosema ceranae* Infection and Bee Survival**. 2015. 110 p. Thesis (Master of Science) – Oregon State University, Oregon, 2015.

KAPLAN, J. Kim. Colony collapse disorder: an incomplete puzzle. **Agricultural Research**, Washington, Estados Unidos da América, v. 60, n. 6, p. 4, jul. 2012.

LAZZARINI, Gustavo M. J. **Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. 2005. 49f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de patologia tropical e saúde pública. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

MALASPINA, Osmar; SOUZA, Tiago F.; ZACARIN, Elaine C.; CRUZ, Aline da S. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: VII Encontro de Abelhas, 2008, Ribeirão Preto. **Anais do VII Encontro de Abelhas**. Ribeirão Preto, 2008, p. 41-48.

MEIKLE, William G.; MERCADIER, Guy; HOLST, Niels; NANSEN, Christian; GIROD, Vincent. Impact of a treatment of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on honeybee (*Apis mellifera*) colony health and on *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). **Apidologie**, v. 39, p. 247-259, out. 2007.

MELO, Itamar S. de; AZEVEDO, João L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

MESSAGE, Dejair; GUIDUGLI-LAZZARINI, Karina R.; FREITAS, Nayara H.; SIMÕES, Zilá L.; SILVA, Izabel C.; TEIXEIRA, Érica W. Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 59, 2011.

MORAES, Simone S.; BAUTISTA, Ana R.; VIANA, Blandina F. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 30-37, mar. 2000.

OLIVEIRA, Mikail O. de. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **ACTA Apícola Brasilica**, Pombal, Paraíba, v. 3, n. 2, p. 01-06, dez. 2015.

PARRA, José R.; BOTELHO, Paulo S.; CORRÊA-FERREIRA, Beatriz S.; BENTO, José M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.

PEREIRA, Fábria; LOPES, Maria T.; CAMARGO, Ricardo C. R.; VILELA, Sérgio L. O. **Produção de mel**. Embrapa Meio Norte, Sistema de Produção, v. 3, jul. 2003.

Disponível em:

<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

PESSOA, Alciani da S. **Bioatividade de extratos vegetais sobre cristais de *Bacillus thuringiensis* Berl., 1915 e sobre *Anticarsia gemmatalis* Hug., 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).** 2011. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Controle Biológico), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2011.

POLANCZYK, Ricardo A.; MARTINELLI, Samuel; OMOTO, Celso; ALVES, Sérgio B. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n. 31, p. 18-27, jul./dez. 2003.

POLANCZYK, Ricardo A.; ALVES, Sérgio B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideo, Uruguai, v. 7, n. 2, p. 1-10, fev. 2004.

POLANCZYK, Ricardo A.; PRATISSOLI, Dirceu; DALVI, Leandro D.; GRECCO, Eduardo D.; FRANCO, Cláudio R. Effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on the biological parameters of *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1412-1416, nov./dez. 2010.

POTRICH, Michele; ALVES, Luis F. A.; HAAS, Jucelaine; SILVA, Everton R. L.; DAROS, Alaxsandra; PIETROWSKI, Vanda; NEVES, Pedro M. O. J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 822-826, nov./dez. 2009.

PRATISSOLII, Dirceu; POLANCZYK, Ricardo A.; VIANNA, Ulysses R.; ANDRADE, Gilberto S.; OLIVEIRA, Regina G. S. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, mar./abr. 2006.

RAMOS, Juliana M.; CARVALHO, Naiara C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, São Paulo, v. 6, n. 10, 10 ago. 2007. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/h4KxXMNL19aDCab\\_2013-4-26-15-37-3.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/h4KxXMNL19aDCab_2013-4-26-15-37-3.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2016.

RUCKER, Randal R.; THURMAN, Walter, N. Colony collapse disorder: the market response to bee disease. **PERC Policy Series**, Bozeman, Montana, Estados Unidos da América, n. 50, jan. 2012.

SANCHES, Sérgio M.; SILVA, Carlos H. T. da; CAMPOS, Sandro X.; VIEIRA, Eny M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, n. 13, p. 53-58, jan./dez. 2003.

SARTO, Mário César L. del. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 75f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SILVA, Aldeni B. da.; BRITO, Janaina M. Controle biológico de insetos-praga e suas perspectivas para o futuro. **Agropecuária Técnica**, Paraíba, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

SILVA, Francisco. Assistat 7.7. Software Estatístico. Campina Grande, Paraíba, 2014.

SILVA, Rita T. L. da. **Seletividade de micro-organismos entomopatogênicos e extratos vegetais a *A. mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2014.

SIMIONATTO, Dieli. **Ação de agentes de controle sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2013, 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS – **AGROFIT**. Dez. 2005. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons.](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.)>. Acesso em: 8 jun. 2016.

SOUZA, Darklê Luiza; EVANGELISTA-RODRIGUES, Adriana; PINTO, Maria do Socorro C. As abelhas como agentes polinizadores. **REDVET: Revista Electrónica de Veterinaria**, Málaga, Espanha, v. 8, n. 3, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307.html>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

TAUTZ, Jürgen. **O fenômeno das abelhas**. Tradução: Gerson R. Neumann. Porto Alegre: Artmed, 2010.

VanENGELSDORP, Dennis; UNDERWOOD, Robyn; CARON, Dewey; HAYES, Jerry. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 –2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. **American Bee Journal**, Hamilton, Estados Unidos da América, v.147, p. 599-603, jul. 2007.

WANG, Yuan-Yuan; LI, Yuh-He; Huang, Zachary Y; Chen, Xiu-Ping; Romeis, Jörg; Dai, Ping-Li; Peng, Yu-Fa. Toxicological, Biochemical, and Histopathological Analyses Demonstrating That Cry1C and Cry2A Are Not Toxic to Larvae of the Honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 6126-6132, jun. 2015.

WILLIAMS, Geoffrey R.; TARPY, David R.; VanENGELSDORP, Dennis; CHAUZAT, Marie-Pierre; COX-FOSTER, Diana L.; DELAPLANE, Keith S.; NEUMANN, Peter; PETTIS, Jeffery S.; ROGERS, Richard E. L.; SHUTLER, Dave. Colony collapse disorder in context. **BioEssays**, v. 32, p. 845-846, out. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.201000075/epdf>>. Acesso em: 26 mar. 2016.