

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

GABRIELA LIBARDONI

DISSERTAÇÃO

**EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS
SINTÉTICOS NA LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

DOIS VIZINHOS

2017

GABRIELA LIBARDONI

**EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS
SINTÉTICOS NA LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, área de Concentração: Produção e Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa

Co-orientadores: Prof^a.Dr^a. Michele Potrich

Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

DOIS VIZINHOS

2017

L694e Libardoni,
Gabriela.

Efeito de *Bacillus thuringiensis* e produtos fitossanitários sintéticos na longevidade de operárias *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) / Gabriela Libardoni – Dois Vizinhos, 2017.
75f.:il.

Orientador: Alfredo de Gouvêa
Coorientador: Michele Potrich
Coorientador: Everton Ricardi Lozano da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos, 2017.
Inclui bibliografia

1. Abelhas africanizadas 2. Pragas – Controle biológico Gouvêa, Alfredo de, orient. II. Potrich, Michele, coorient. III. Silva, Everton Ricardi Lozano da, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos V. Título

CDD: 638.1

Ficha catalográfica elaborada por Rosana da Silva CRB: 09/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 078

Efeito de *Bacillus thuringiensis* e de produtos fitossanitários sintéticos na longevidade de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

Gabriela Libardoni

Dissertação apresentada às nove horas do dia vinte de fevereiro de dois mil e dezessete, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Alfredo de Gouvêa
UTFPR-DV

Fabiana Martins Costa Maia
UTFPR-DV

Aline Pomari Fernandes
UFFS

Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique
Coordenador do PPGZO

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado à vida, saúde e força para os dias difíceis dessa longa caminhada.

Aos meus pais, Dalmo e Vera, e ao meu irmão, Felipe, por todo o apoio, dedicação e pela força nos piores e melhores momentos, sempre levantando a minha cabeça e em momento algum me deixando desistir desse sonho, que é nosso.

Ao meu namorado, que em momento algum mediu esforços pra me ajudar, inclusive nas análises da madrugada e nas idas ao apiário, não me deixando nunca sozinha.

A essa universidade (UTFPR/DV), seu corpo docente, direção e administração.

Ao Prof. Dr. Alfredo Gouvêa, meu orientador, pelo incentivo.

À Prof^a Dra. Michele Potrich, co-orientadora, pelo comprometimento onde não mediu esforços, me ajudando e incentivando sempre que possível.

Ao Prof. Dr. Everton Ricadi Lozano da Silva, pela co-orientação, pelo apoio e colaboração em diversos momentos.

À Prof^a Dra. Fabiana Martins Costa Maia, por disponibilizar a equipe da UNEPE Apicultura na coleta das abelhas.

À Prof^a Dra. Patrícia Franchi de Freitas pelo auxílio nas análises histológicas, inclusive dedicando alguns dias das suas férias para fazer as análises.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico, Dionislei e Rodrigo pelo auxílio fundamental na condução do experimento. Em especial a Fernanda Colombo, pelas orientações, disponibilidade e pela ajuda na execução deste trabalho.

Aos alunos da UNEPE apicultura, pela disponibilidade e paciência na obtenção dos quadros com abelhas, Fernanda, Raquel, Elisete e João.

Aos professores que compõe a minha banca, por aceitar o convite e vir acompanhar a minha defesa.

A todos os meus familiares, colegas, compadres e amigos que de maneira direta ou indireta enviaram energias positivas para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos.

A todos vocês, obrigada!!!

RESUMO

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) estão desaparecendo e acredita-se que seja devido ao intenso uso de inseticidas, poluição e alterações climáticas, no entanto muitas culturas dependem da polinização realizada por essas abelhas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três linhagens de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (IPS 82, BR 81 e BR 147), entomopatogêno utilizado para o controle de lagartas desfolhadoras, e de três produtos fitossanitários sintéticos (PFS 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; PFS 2: Imidacloporido + Beta-Ciflutina e PFS 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato), sobre a longevidade de operárias adultas de *A. mellifera* africanizada. Foram realizados três bioensaios com as linhagens de Bt e dos PFSs: A) Pulverização sobre *A. mellifera*; B) Contato de *A. mellifera* com superfície pulverizada e C) Pasta cãndi incorporada com os produtos e análise histológica do intestino médio das abelhas. Nos três bioensaios a testemunha foi composta por água deionizada esterilizada. Cada tratamento foi composto por 60 abelhas, sendo cada abelha considerada uma repetição. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada tipo BOD ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$) e a longevidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72; 96; e 120 horas. Na pulverização de Bt sobre *A. mellifera* verificou-se que apenas a linhagem Bt 1 (IPS 82) causou redução da longevidade de operárias (88,7 horas), enquanto no bioensaio de contato a linhagem Bt 3 - BR147 provocou redução (101,2 horas). Todas as linhagens de Bt avaliadas, quando incorporadas à alimentação de *A. mellifera* reduziram a longevidade das operárias (Bt 1 – IPS 82: 64,50 horas; Bt 2 – BR 81: 64,56 horas e Bt 3 – BR 147: 60,00horas) e com a análise histológica pôde-se perceber a desintegração das células epiteliais do mesêntero das abelhas, causada pelas bactérias que elas ingeriram. Os três produtos fitossanitários sintéticos reduziram a longevidade das operárias de *A. mellifera*, no bioensaio de pulverização direta (PFS 1 e PFS 2 – 1,0 hora; PFS 3 – 2,21 horas). No contato de *A. mellifera* com superfície pulverizada com PFS, as abelhas ficaram duas horas em contato com os produtos na placa de Petri, e ao final dessas duas horas, 100% abelhas que entraram em contato com os três produtos fitossanitários sintéticos estavam mortas. Quando incorporados os PSFs na alimentação, ambos reduziram a longevidade das operárias (PFS 1 – 22 horas, PFS 2 – 21,72 horas e PFS 3 – 43,93 horas) e na análise histológica foi possível observar diferenças na estruturação do intestino médio das operárias de *A. mellifera* alimentadas com os três PFSs. Apesar das linhagens de Bt reduzirem a longevidade das operárias de *A. mellifera* não é possível afirmar que não sejam seletivas, pois a interferência é mínima quando comparada à interferência provocada pelos PFSs, os quais provocaram drástica redução na longevidade de *A. mellifera*.

Palavras-chave: Abelha africanizada; bactéria entomopatogênica; inseticida.

ABSTRACT

Africanized bees (*Apis mellifera* L.) are disappearing and are believed to be due to the intense use of insecticides, pollution and climate change, however many crops depend on the pollination performed by these bees. The objective of this work was to evaluate the effect of three strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt) (IPS 82, BR 81 and BR 147), entomopathogen used for the control of leafhopper caterpillars, and three synthetic phytosanitary products (PFS 1: Acetamiprid + Alpha-cypermethrin, PFS 2: Imidacloporide + Beta-Cyflutin and PFS 3: Fenitrothione + Esfenvalerate), on the longevity of African female *A. mellifera* workers. Three bioassays were performed with the Bt and PFS lines: A) Spraying on *A. mellifera*; B) *A. mellifera* contact with pulverized surface and C) Candi paste incorporated with the products and histological analysis of the medium intestine of the bees. In the three bioassays the control was composed of sterilized deionized water. Each treatment consisted of 60 bees, each bee being considered a repetition. The bioassays were maintained in a BOD type chamber ($34 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ U.R) and the workers longevity was evaluated at one; two; three; four; five; six; nine; 12; 13; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72; 96; And 120 hours. In Bt spraying on *A. mellifera*, it was verified that only the Bt 1 strain (IPS 82) caused a reduction in worker longevity (88.7 hours), while in the contact bioassay the Bt 3 - BR147 strain caused a reduction (101, 2 hours). All strains of Bt evaluated when incorporated into *A. mellifera* feed reduced workers longevity (Bt 1 - IPS 82: 64.50 hours; Bt 2 - BR 81: 64.56 hours and Bt 3 - BR 147: 60). And the histological analysis showed the disintegration of the epithelial cells of the bees mesentery, caused by the bacteria they ingested. The three synthetic phytosanitary products reduced the longevity of *A. mellifera* workers in the direct spray bioassay (PFS 1 and PFS 2 - 1.0 hour; PFS 3 - 2.21 hours). At the contact of *A. mellifera* with a PFS-sprayed surface, the bees stayed two hours in contact with the products on the petri dish, and at the end of these two hours, 100% bees that came in contact with the three synthetic phytosanitary products were dead. When the PSFs were incorporated in the diet, they reduced the longevity of the workers (PFS 1 - 22 hours, PFS 2 - 21.72 hours and PFS 3 - 43.93 hours) and in the histological analysis it was possible to observe differences in the workers from *A. mellifera* fed with the three PFSs. although the Bt lineages reduce the longevity of *A. mellifera* workers, it is not possible to assert that they are not selective, since the interference is minimal when compared to interference caused by PFSs, which caused a drastic reduction in the longevity of *A. mellifera*.

Key words: africanized bee; entomopathogenic bacteria; insecticide.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após pulverização de três linhagens de *Bacillus thuringiensis*, sobre operárias adultas de *Apis mellifera*. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.39

Figura 2. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato em placa de Petri de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis*. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.41

Figura 3. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após alimentação de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis*. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.42

Figura 4. Fotomicrografia de luz de mesêntero de *Apis mellifera* (Microscópio Biológico Binocular de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 40X). Abelhas operárias alimentadas com: A) Pasta cândi pura; B) Pasta cândi + Bt 1 – IPS 82, C) Pasta cândi + Bt 2 – BR 81, D) Pasta cândi + Bt 3 – BR 147.43

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após pulverização direta de três produtos fitossanitários sintéticos, sobre operárias adultas de *Apis mellifera*. PFS: Produto fitossanitário sintético.61

Figura 2. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato em placa de Petri de operárias adultas de *Apis mellifera* com água deionizada esterelizada. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.61

Figura 3. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após alimentação de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes produtos fitossanitários sintéticos. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de

60 ± 5%). UTFPR, *Câmpus* Dois Vizinhos, PR, 2016. PFS: Produto fitossanitário sintético.62

Figura 4. Fotomicrografia de luz de mesêntero de *Apis mellifera* (Microscópio Biológico Binocular de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 40X). Abelhas operárias alimentadas com: A) Pasta cândi pura; B) Pasta cândi + Produto 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; C) Pasta cândi + Produto 2: Imidacloprido + Beta-Ciflutrina; D) Pasta cândi + Produto 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato.62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Longevidade média (em horas) \pm EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após serem submetidas a três bioensaio com *B. thuringiensis*. Temperatura ($34 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$).39

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Produtos Fitossanitários Sintéticos (PFS) utilizados nos bioensaio, princípio ativo, grupo químico, cultura indicada, insetos alvos, dosagem e calda.59

Tabela 2. Longevidade média (em horas) \pm EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após serem submetidas a três bioensaio com produtos fitossanitários sintéticos. (Temperatura $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$).60

LISTA DE SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
B.O.D	Demanda Biológica de Oxigênio
Bt	<i>Bacillus thurigiensis</i>
°C	grau Celsius
CO ²	dióxido de carbono
Cry	Proteínas Cristal
cm	Centímetros
DCC	Desordem do Colapso das Colônias
g	grama
H/E	Hematoxilina/Eosina
h	hora
kDa	quilodalton
kgf/cm	quilograma-força por centímetro
L	litro
mL	mililitro
mm	milímetros
ng	nanograma
PSF	Produto fitossanitário sintético
UEL	Universidade Estadual de Londrina
µm	micrometro
UNEPE	Unidade de Ensino e Pesquisa
UTFPR/DV	Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Dois Vizinhos
U. R.	umidade relativa

SÚMARIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 <i>Apis mellifera</i> E A POLINIZAÇÃO	15
1.2 <i>Apis mellifera</i> E A APICULTURA	16
1.3 COLAPSO OU DESORDEM DAS ABELHAS	17
1.4 CONTROLE BIOLÓGICO	19
1.5 <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
1.6 PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS (PFS)	22
REFERÊNCIAS.....	24
2 CAPÍTULO I - EFEITO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> NA LONGEVIDADE DE <i>Apis mellifera</i> L. AFRICANIZADA	33
RESUMO	33
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
OBTENÇÃO DE <i>Apis mellifera</i> E <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
BIOENSAIO 1: PULVERIZAÇÃO DE <i>B. thuringiensis</i> SOBRE <i>A. mellifera</i>	36
BIOENSAIO 2: CONTATO DE <i>A. MELLIFERA</i> COM SUPERFÍCIE PULVERIZADA COM <i>B. thuringiensis</i>	36
BIOENSAIO 3: PASTA CÂNDI INCORPORADA COM <i>B. thuringiensis</i>	37
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	46
3 CAPÍTULO II - EFEITO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA (<i>Glycine max</i> L.) SOBRE A LONGEVIDADE DE <i>Apis mellifera</i> L.	50
RESUMO	50
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
OBTENÇÃO DE <i>Apis mellifera</i> E DOS PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS.....	52
BIOENSAIO 1. PULVERIZAÇÃO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS SOBRE <i>A. MELLIFERA</i>	52
BIOENSAIO 2. CONTATO DE <i>A. MELLIFERA</i> COM SUPERFÍCIE PULVERIZADA COM PRODUTO FITOSSANITÁRIO SINTÉTICO	53

BIOENSAIO 3. PASTA CÂNDI INCORPORADA COM PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS.....	53
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	57
FIGURAS:	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
APÊNDICE A.....	65
APÊNDICE B.....	70
APÊNDICE C	80

INTRODUÇÃO GERAL

A apicultura começou a ser explorada aproximadamente, há 2400 anos a.C., (BRASIL, 2003), sendo relatadas mais de 20 mil espécies de abelhas no mundo, sendo que no Brasil são mais de 3 mil espécies, a maioria de abelhas nativas sem ferrão (BRASIL, 2015). Acredita-se que esse número ainda possa aumentar, pois todo ano novas espécies vem sendo descobertas (BRASIL, 2012). As abelhas apresentam uma biodiversidade maior em regiões temperadas, apesar de estarem presentes desde as regiões mais frias até os desertos mais quentes do planeta (SYDNEY; GONÇALVES; FARIA, 2010).

As colônias de abelhas podem ser consideradas um superorganismo, no qual cada um dos indivíduos exerce suas funções, e eles sozinhos não conseguem sobreviver, pois dependem de interações entre eles, comportando-se como um indivíduo único, se um falha, pode comprometer o desenvolvimento de todos (STABENTHEINER; KOVAC; BRODSCHNEIDER, 2010; GONÇALVES; MARQUES, 2012). Poucas são as espécies de abelhas que oferecem produtos de valor econômico, medicinal ou nutritivo como mel, pólen, geleia real, cera, mas todas elas tem uma importante função na polinização que prestam para plantas silvestres ou de culturas cultivadas, contribuindo significativamente com a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas e na produtividade agrícola (COELHO, 2005).

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) pertencem ao filo Artropoda e à ordem Hymenoptera, são conhecidas como insetos sociais por viverem em uma sociedade hierárquica. Nessa sociedade há uma abelha rainha que é responsável pela reprodução, as operárias que trabalham em prol da colônia, e os zangões (em menor quantidade) que tem função de se acasalar com a rainha, garantindo a reprodução, o bom desenvolvimento além de ajudarem na manutenção da temperatura interna da colônia (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; STRAUB et al., 2016).

A divisão de trabalho das operárias de *A. mellifera* é dada de acordo com o desenvolvimento glandular, intensidade das atividades dentro da colônia ou ainda podendo variar e também pelo tempo de vida, as abelhas do 1º ao 5º dias após a emergência, são responsáveis pela limpeza das crias recém emergidas e dos alvéolos, do 5º ao 10º dia alimentam as crias, do 11º ao 20º

dia são responsáveis pela produção de cera para construção dos favos e recebem e desidratam o néctar trazido pelas abelhas forrageiras, do 18º ao 21º dia ficam responsáveis pela defesa da colônia contra agentes patogênicos ou organismos que queiram invadir a colônia e as abelhas com mais de 21 dias fazem a coleta de néctar, pólen e água, sendo conhecidas como abelhas forrageiras pois, elas passam pouco tempo dentro dos ninhos (SEELEY, 1982; JOHNSON, 2008; ARRUDA, 2010).

As abelhas africanizadas (*A. mellifera*) chegaram ao Brasil por volta de 1956 e devido a sua alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos e a capacidade de reprodução com ciclos de vida mais curto conseguiram sobreviver (RINDERER; SHEPPARD, 1993). Além disso, *A. mellifera* africanizada é uma mistura da abelha europeia com a abelha africana, desta forma nas colônias que estão na região Sul do Brasil predominam as características das europeias e nas do Norte, das abelhas africanas, fazendo com que a espécie se adaptasse melhor no país (DALLY; BALLING, 1978; RAMOS; CARVALHO, 2007).

1.1 *Apis mellifera* E A POLINIZAÇÃO

Muitas culturas agrícolas no mundo possuem como fator fundamental de produção a polinização por insetos (entomofilia) (CHIARI et al., 2008) e isso traz benefícios para as culturas, como o aumento da qualidade dos frutos, diminuição da má-formação dos mesmos, aumento no teor de óleos e ainda uniformiza o processo de amadurecimento reduzindo as perdas das colheitas, além de melhorar a qualidade da fisiologia das sementes produzidas e aumentar a variabilidade genética daquelas plantas (CRUZ et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2012; OLIVEIRA; NICODEMO; OLIVEIRA, 2015). Enquanto isso, a ausência dos agentes polinizadores acarreta em baixa produtividade de frutos, falta de padronização quanto a forma, aspecto, sabor, tamanho e formato, o que pode gerar problemas no rendimento e no lucro para o produtor (COBRA et al., 2015).

Dentre o grupo de insetos polinizadores, as abelhas são os principais, 10% da polinização da soja, por exemplo é feita por insetos, e desses, 50% é

realizado pelas abelhas (MORSE; CALDERONE, 2000). A soja da variedade Santa Rosa, polinizada por insetos, aumentou o número e o peso de vagens em média 38%, em relação as que não foram submetidas a polinização por insetos (MORETI et al., 1999). Do mesmo modo, a soja polinizada por *A. mellifera* apresentou um aumento na produtividade de grãos quando comparada à soja não polinizada por estas abelhas (CHIARI et al., 2008). Ainda sobre a soja, Chiari et al. (2008) verificaram um aumento de aproximadamente 37% na produção dos grãos tanto de uma cultivar transgênica, quanto de uma convencional, na presença de abelhas *A. mellifera*.

Na espécie de amoreira-preta (*Rubus* sp.) a polinização realizada tanto por abelhas nativas quanto por *A. mellifera* foi essencial para a produção de frutos maiores e de melhor qualidade, demonstrando um melhor desempenho dos frutos na presença dos insetos (MELLO JUNIOR; ORTH; MORETTO, 2011).

Colônias de *A. mellifera* nos cultivos da canola, acarretaram um aumento na produção das sementes e incrementaram a produtividade em relação a polinização manual, também utilizada nesse experimento (ROSA; BLOCHTEIN, 2011).

Há maior atenção à importância das abelhas e o interesse na manutenção destas, principalmente em meios agrícolas, por serem organismos polinizadores, o que contribui para o aumento da produção e melhor qualidade dos produtos. Destaca-se assim a relevância de manter a sobrevivência dessas espécies evitando a extinção, o que poderia acarretar sérios problemas na economia agrícola, como a redução e o desaparecimento de diversos alimentos (SANFORD, 2003), bem como a importância desta espécie no equilíbrio da biodiversidade.

1.2 *Apis mellifera* E A APICULTURA

A produção de mel, por meio da apicultura, vem gerando cada vez mais empregos e renda por apresentar um rápido retorno financeiro sem agredir a natureza, e sim favorecendo-a (BRASIL, 2012). Devido a isso, do Brasil essa atividade vem crescendo cada vez mais, tanto que nos últimos 40 anos a

produção aumentou mais de 10 vezes (SEBRAE, 2014). Em 2009, no Brasil ficava em torno das 38 mil toneladas, e em 2010 foi para 50 mil toneladas fazendo com que o Brasil ficasse em 11º lugar no ranking mundial de exportação do mel (BRASIL, 2011). Em 2014 a exportação de mel gerou US\$ 98 milhões no Brasil, pois além do aumento do preço do produto, as vendas no exterior cresceram cerca de 82% em relação ao ano anterior, acredita-se que isso só foi possível devido a qualidade do mel brasileiro, as condições de solo, clima, a diversidade floral e a genética das abelhas daqui (BRASIL, 2015).

A região com maior produção de mel no país é a do Sul. Até 2009, cerca de 16% do mel produzido no Brasil era proveniente do Paraná, fazendo com que este estado estivesse em segundo lugar em produção de mel no país (PARANÁ, 2009). Em 2009, 4,8 mil toneladas de mel foram produzidas no estado, e isso só foi possível pois diversos apicultores também trabalhavam com fruticultura, horticultura e agricultura orgânica, o que favoreceu a produção de mel, por utilizarem produtos alternativos ao invés de químicos no controle de pragas e doenças (SEBRAE, 2014). Já no ano de 2015, o Paraná subiu para a primeira posição no ranking de produção de mel do Brasil, sendo produzidos 16,6% do mel do país, totalizando 37.816 toneladas (IBGE, 2017). O município de Dois Vizinhos, no ano de 2015, produziu 5.000 quilogramas de mel, gerando uma renda de 54.360,00 de reais entre os produtores (SEAB, 2015).

1.3 COLAPSO OU DESORDEM DAS ABELHAS

Nos últimos anos, alguns apicultores e a comunidade científica começaram a perceber um desaparecimento das abelhas (*A. mellifera*) em diversos países do mundo (HAMIDUZZAMAN et al., 2012). Segundo Pettis et al. (2012) as interações entre os inseticidas e os agentes patogênicos podem ser as principais causas desta mortalidade das colônias de abelhas.

As abelhas, nativas e melíferas (*A. mellifera*), estão passando por uma fase de desaparecimento em diversas partes do mundo. Principalmente na Europa e em alguns países da América do Norte, onde as colônias são afetadas pelo despovoamento durante o inverno (DAINAT et al., 2012; OLIVEIRA, 2015).

Esse desaparecimento recebeu o nome de Desordem do Colapso das Colônias (DCC). Segundo Potts et al. (2015) existem vários possíveis fatores como os fungos e vírus parasitas e o ácaro *Varroa destructor*, que se reproduz apenas dentro das colmeias, sugam a hemolinfa e transmitem doenças para as larvas, o que leva o enfraquecimento das colônias.

Outro possível fator é o intenso uso de inseticidas agrícolas (produtos fitossanitários sintéticos) que geralmente são altamente tóxicos para as abelhas. Quando as abelhas operárias saem para realizar o forrageamento em busca de alimento para sua colônia, nas lavouras, elas podem entrar em contato com esses produtos que em doses muito altas ou dependendo do seu princípio ativo podem causar a morte imediata desses insetos, ou em doses menores podem levá-las a perder a direção sem conseguirem voltar para a sua colônia (CARVALHO et al., 2009), ou ainda, quando voltam, acabam levando esses produtos para dentro da colônia, o que com o passar do tempo pode levar ao enfraquecimento e até mesmo a morte da colmeia (AMARO; GODINHO, 2012).

Outra causa pode ser a estratificação das florestas que faz com que as colônias fiquem separadas diminuindo o fluxo gênico da espécie e conseqüentemente, diminuindo a variabilidade genética (KINOSHITA et al., 2006). A diminuição da quantidade de alimentos para as abelhas devido ao frequente desmatamento e destruição das árvores que elas utilizaram para buscar o pólen para levar até as colônias e ainda com as derrubadas e queimadas os ninhos e enxames de abelhas são completamente destruídos, causando um forte impacto no clima e nos biomas (NRCS, 2008; BAPTISTA et al., 2009).

A importância direta e indireta das abelhas pra humanidade é destacada, pois com o processo de polinização por elas realizado obtém-se a maior parte dos alimentos consumidos e com o aumento do DCC pode-se acabar comprometendo a produção de alimentos (OLIVEIRA, 2015). Diante dessas situações, para que o problema não se agrave, para que a agricultura não enfraqueça e o desaparecimento total das colônias de abelhas não aconteça, deve-se encontrar equilíbrio entre as cadeias produtivas, além de desenvolver programas de segurança, monitoramento e conservação desse importante

grupo de insetos e de outros polinizadores que por fatores semelhantes também estão desaparecendo.

Por isso testes de seletividade dos produtos fitossanitários sintéticos e dos produtos de controle biológico utilizados na agricultura devem ser realizados, para tentar controlar o que vem sendo chamado de DCC (HAMIDUZZAMAN et al., 2012).

1.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de pragas começou a aparecer por volta de 1200 a.C., quando agricultores chineses utilizavam bambus entre as plantas cítricas, para que fosse facilitado o acesso das formigas nas plantas para que elas comessem as lagartas desfolhadoras (ERTHAL JUNIOR, 2011). O controle biológico é um método utilizado, cuja função é reduzir a população de uma espécie-alvo que causa danos econômicos em cultivares agrícolas. Esta técnica é viável no combate a insetos-praga, plantas daninhas, nematoides, patógenos de plantas, entre outros com a utilização de inimigos naturais (entomófagos) e dentre estes, fungos, nematoides, bactérias, vírus, parasitoides e predadores, evitando assim que organismos não-alvos sejam afetados (PARRA et al., 2002; PENTEADO, 2007; ROMEIRO, 2007).

Cada vez mais vem sendo utilizado e destacado o uso de agentes de controle biológico no controle de pragas agrícolas, a fim de minimizar o efeito dos inseticidas, que por vezes acabam matando organismos não-alvo (como as abelhas *A. mellifera*), ou até mesmo repelindo-os, fazendo com que eles diminuam o processo natural de polinização. Porém, em alguns casos esta técnica pode não ser tão satisfatória, por isso deve-se sempre testar esses produtos antes de aplicá-los na cultura (BARBOSA, 2004).

Dentro do controle biológico, tem-se o controle microbiano, o qual utiliza entomopatógenos de maneira adequada. O qual apresenta como vantagens a especificidade e a seletividade desses organismos de controle, facilidade de multiplicação, ausência de poluição e danos a organismos não-alvos, entre outras (ALVES, 1998).

Existem diversos bioinseticidas produzidos, registrados e comercializados à base de micro-organismos entomopatogênicos. Dentre esses, os produzidos em maior quantidade são os bioinseticidas a base de bactérias entomopatogênicas, pela facilidade na produção, além de apresentarem longa vida de prateleira e serem consideradas seguras ao ecossistema, sem deixar resíduos químicos no ambiente (PAPA; CELOTO, 2014; AGROFIT, 2017).

A prevenção da saúde pública e dos processos de degradação do meio ambiente fizeram com que o controle microbiano se expandisse ainda mais. Os bioinseticidas são utilizados como método complementar no controle de pragas na agricultura convencional, já na agricultura orgânica, eles são utilizados como um dos principais métodos de controle. Um desses bioinseticidas é *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bt), considerado específico e seletivo a organismos não-alvo (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010), ou seja, eles atingem diretamente os insetos que estão causando algum tipo de dano na agricultura e não afetam os polinizadores, por exemplo, que não são o alvo.

Além de *B. thuringiensis* ter capacidade inseticida não trás problemas de contaminação aos humanos e outros animais, é de fácil manutenção (principalmente em laboratórios) e tem um impacto ambiental mínimo quando comparado com produtos fitossanitários sintéticos por exemplo.

1.5 *Bacillus thuringiensis*

A primeira tentativa do uso de bactérias da espécie *B. thuringiensis* no controle de insetos ocorreu na Europa durante a década de 1930, e devido aos bons resultados é que possibilitou a expansão do uso dessa bactéria no controle biológico (FIUZA, 2010).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram positiva, capaz de produzir um cristal proteico que contém toxinas com propriedades inseticidas, essa bactéria atua contra espécies pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, bem como a várias outras espécies de artrópodes, nematoides e platelmintos (SILVA; BRITO, 2015). A bactéria *B. thuringiensis* produz

diferentes proteínas tóxicas denominadas cristais proteicos (SOUZA et al., 1999), esses cristais, ou proteínas Cry, quando são ingeridas pelo inseto, rompem a parede do intestino, o que os faz paralisar imediatamente a alimentação (HOFTE; WHITELEY, 1989). Quando o inseto ingere os esporos da bactéria, estes se multiplicam e germinam no sistema digestivo causando septicemia (CARNEIRO et al., 2009).

Essa bactéria possui um mecanismo de ação eficaz contra lagartas e é utilizada na cultura da soja (*Glycine max* L.) substituindo o uso de produtos químicos (AGROFIT, 2017). A toxicidade dela é causada pela produção de cristais durante a esporulação. Após a ingestão deles, no intestino do inseto o cristal encontra condição ideal (pH > 12) para ser dissolvido e absorvido, transformando-se em substância tóxica para a lagarta. As toxinas unem-se as células do epitélio formando pequenos orifícios que desestabilizam o controle osmótico e iônico, permitindo a saída do líquido digestivo para dentro do corpo do inseto. E levando consigo bactérias, o que pode causar uma infecção generalizada, fazendo com que o inseto pare de se alimentar em no máximo cinco minutos, matando-o (ALVES, 1998; HABID; ANDRADE, 1998; FIUZA, 2010).

Brighenti et al. (2007) verificaram que a pulverização de Bt sobre as abelhas operárias adultas de *A. mellifera* fez com que 52,4% das abelhas morressem após 96 horas de análise. E a alimentação das mesmas com pasta Cândi contendo Bt causou mortalidade de 57,6% das abelhas no mesmo período.

Aplicações aéreas de *B. thuringiensis* à campo, não interferiram no desempenho das colônias de abelhas *A. mellifera*, ou seja, as colônias não foram afetadas quanto a produção de crias (LEZA et al., 2014).

O intestino médio de abelhas *A. mellifera*, expostas a concentração recomendada pelo fabricante do produto a base de *B. thuringiensis* (100.0 g/hL), não foram afetados, bem como a sobrevivência das abelhas. Confirmando assim a menor toxicidade da bactéria em relação a outros produtos fitossanitários sintéticos (D'URSO et al., 2016).

As linhagens diferentes de *Bacillus* podem gerar futuros produtos, pois já são testados sobre insetos praga. E mesmo que essas linhagens sejam patogênicas aos insetos praga, é de extrema importância os testes de

seletividade sobre organismos não-alvos, já que eles podem ser afetados, e acabar levando a um desequilíbrio ambiental (POLANCZYK et al., 2003).

1.6 PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS (PFS)

A demanda da produção agrícola mundial está crescendo cada dia mais, e os produtores estão em busca de rendimentos cada vez maiores, com isso, passou a se utilizar com mais frequência produtos fitossanitários sintéticos (PFS) nas mais diversas culturas para diminuir os danos causados por insetos-praga da agricultura, pois estes causam sérios danos e prejuízos as plantações, e isto passou a ser realizado com base nos agrotóxicos que trazem um resultado imediato ao problema, ou seja, o uso de agrotóxicos recaem sobre a maioria da população ao possibilitar a produção de alimentos em larga escala a um custo mais baixo (MELO; AZEVEDO, 2000).

Isso vem ocorrendo devido a intensa pressão do mercado e da economia, que busca grandes rendimentos em intervalos de tempo curtos.

Porém, estes PFSs podem entrar na cadeia solo-água-plantas, representando ameaça direta e indireta de contaminação para outros seres vivos que podem não ser organismos alvos. Como a morte de insetos polinizadores, intoxicação de humanos e outros animais, poluição da água e de lençóis freáticos, redução da fertilidade do solo, entre outros (SOUZA, 2013).

Os PFSs mais utilizados na agricultura são os herbicidas, seguidos dos inseticidas, fungicidas e acaricidas (JARDIM; ANDRADE, 2009). Em 2002, aproximadamente 90% dos inseticidas eram neurotóxicos, ou seja, danificavam o sistema nervoso central, especificamente na transmissão dos impulsos nervosos pelas células nervosas dos insetos que entram em contato com eles (GALLO et al., 2002).

Os inseticidas sintéticos são aplicados de maneira direta ou indireta sob os insetos em dosagens que lhes causará morte. Cada um deles tem uma toxicidade diferente conforme seus componentes químicos (GALLO et al., 2002).

Dentre os diferentes grupos químicos de inseticidas, tem-se os neonicotinoides que agem na propagação do impulso nervoso e são agonistas

da acetilcolina. Por esse fato, as moléculas desses inseticidas ligam-se aos receptores da acetilcolina localizados no neurônio pós-sináptico de maneira irreversível, pois eles não são sensíveis à ação da enzima acetilcolinesterase, fazendo com que os impulsos nervosos ocorram continuamente hiperexcitando o sistema nervoso (GALLO et al., 2002; FARIA, 2009).

Imidacloprido é um inseticida neonicotinoide, liberado e utilizado na agricultura (AGROFIT, 2017) e apesar de seus efeitos sobre os insetos-pragas serem benéficos, os efeitos sobre a abelha *A. mellifera* ainda é controverso. Operárias adultas de 2 a 10 dias de idade, quando expostas a doses subletais de imidacloprido, apresentaram desempenho negativo, prejudicando os trabalhos internos das abelhas na colônia (GOÑALONS; FARINA, 2015). Operárias de *A. mellifera* tratadas com alimento com dose subletal de imidacloprido (0,0015g/abelha) apresentaram redução significativa de voo e de atividade de forrageamento (SCHNEIDER et al. 2012).

O imidacloprido está entre os inseticidas de contato mais potentes. Larvas de *A. mellifera* que receberam alimento contaminado com esse inseticida apresentaram 66% das células do intestino médio com morte celular apoptótica (GREGORC; ELLIS 2011).

Alguns inseticidas, como os piretróides, atuam na transmissão iônica, atuando nos canais de sódio das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos. Isso faz com que esses canais permaneçam abertos por um tempo maior o que gera hiperexcitação, ataxia, convulsões, hipersensibilidade, tremores e paralisias (GALLO et al., 2002).

Quando colocado abelhas africanizadas *A. mellifera* em bioensaios por meio de pulverização, ingestão de alimento contaminado e contato com superfícies tratadas com deltametrina, um piretroide, foi possível avaliar a toxicidade deste produto quando no contato com superfícies contaminadas e quando ele foi ingerido, já quando aplicada diretamente sobre os insetos a toxicidade foi menor (CARVALHO et al., 2009).

O piretroide Deltametrina[®] quando aplicado por ingestão sobre operárias de *A. mellifera* [doses baixas (10 ng / abelha) e altas (100 ng / abelha)] prejudicou o desempenho destas nas suas funções dentro das colônias (THANY et al., 2015).

Já o grupo dos inseticidas organofosforados em 2013 fizeram parte dos mais utilizados no controle de pragas, e corresponderam por cerca de 40% do mercado de agrotóxicos (SOUZA, 2013). Este inseticida atua inibindo a acetilcolinesterase e isso leva a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses, levando a hiperexcitação do sistema nervoso causando síndrome colinérgica e a morte do animal (GALLO, et al., 2002).

O inseticida organofosforado Acefato[®] apresenta-se altamente tóxico para as operárias africanizadas de *A. mellifera* causando após 40 horas de sua aplicação, mortalidade de quase toda a população. Além disso, as abelhas apresentaram perda da coordenação motora, tremores e prostração (BAPTISTA, et al., 2008).

Assim, verifica-se que a produção agrícola intensiva e o uso de produtos nas culturas vêm prejudicando cada vez mais as abelhas, que não são o alvo, mas acabam sendo afetadas direta ou indiretamente (GLIESSMAN, 2005). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de três linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas no controle biológico de pragas da agricultura sobre abelhas operárias de *A. mellifera*, e também de três produtos fitossanitários sintéticos (inseticidas) utilizados no plantio da soja (*G. max*), uma cultura muito comum na agricultura da região Sudoeste do Paraná.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 jan. 2017.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e Abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p.53-62, mar. 2012.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p.945-958, 2010.

ARRUDA, V. M. **Efeito da cafeína no comportamento e na longevidade de operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2010. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2013.

BAPTISTA, A. P. M. et al. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p.955-961, 2009.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 215p.

BRASIL. F. M. P.. Embrapa. **Produção de mel: Introdução e histórico**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

BRASIL, Portal. **Investimentos em apicultura geram trabalho e renda no Semiárido**. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cidadania-e-justica/2012/10/semiarido-investe-em-apicultura-para-tentar-reduzir-pobreza>>. Acesso em: 22 abr. 2016.

BRASIL, Portal. **Exportação de mel soma US\$ 98 milhões em 2014**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/02/exportacao-de-mel-soma-us-98-milhoes-em-2014>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

BRASIL, Portal. **Produção de mel cresce 30% em 2010**. 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2011/03/producao-de-mel-cresce-30-em-2010>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

BRIGHENTI, D. M. et al. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p.279-289, 2007.

CARNEIRO, A. A. et al. Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. **Circular Técnica: Embrapa**, v. 135, n. 2, p. 1-25, 2009.

CARVALHO, S. M. et al. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: apidae). **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p.197-206, 2009.

CHIARI, W. C. et al. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 2, p.267-271, 2008.

CRUZ, D. O. et al. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 12, p.1197-1201, 2005.

COBRA, S. S. O. et al. Características florais e polinizadores na qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p.54-62, 2015.

COELHO, M. A.. Warwick Kerr: a Amazônia, os índios e as abelhas. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 53, p.51-69, 2005.

DAINAT, B. et al. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. **Plos One**, v. 7, n. 2, p.1-9, 2012.

DALLY, H. V.; BALLING, S. S. Identification of Africanized Honeybees in the Western Hemisphere by Discriminant Analysis. **Journal Of The Kansas Entomological Society**, v. 51, n. 4, p.857-869, 1978.

D'URSO, V. et al. Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea) under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. **Apidologie**, v. 48, n. 1, p.51-62, 2016.

ERTHAL JUNIOR, M. Controle biológico de insetos pragas. In: Seminário Mosaico Ambiental: Alhares Sobre o Ambiente, 1., 2011, Campos do Goytacazes. **Proceedings...** . Campos do Goytacazes, 2011. p. 1 - 16.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.5, n.2, p.345-358, 2009.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 38, p.32-35, 2010.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**, 3ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

GREGORC, A.; ELLIS, J. Cell death in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.200-207, 2011.

GOÑALONS, C. M.; FARINA, W. M. Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult Honeybee Behaviour. **Plos One**, v. 10, n. 10, p.1-15, 2015.

GONÇALVES, R. C.; MARQUES, M. D.. Ritmos de populações: o caso das abelhas sem ferrão. **Revista de Biologia**, v. 9, n. 3, p.53-57, 2012.

HABID, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S.. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998. Cap. 12. p. 383-446.

HAMIDUZZAMAN, M. M .D. et al. 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**, v. 111, p.237-243, 2012.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology And Molecular Biology**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal. **BRASIL e PARANÁ - Produtos de origem animal: participação percentual e “ranking” nacional, 2015**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/nppr.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012, 2009.

JOHNSON, B. R.. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 62, p.777-784, 2008.

KINOSHITA, L. S. et al. Composição florística e síndromes de polinização e de dispersão da mata do Sítio São Francisco, Campinas, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 2, p.313-327, 2006.

LEZA, M. del M. et al. First field assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Spanish Journal Of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p.405-408, 2014.

MELLO, I. S. de; AZEVEDO, J. L de A. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 388p.

MELLO JUNIOR, L. J. de; ORTH, A. I.; MORETTO, G.. Ecologia da polinização da amoreira-preta (*Rubus* sp) (Rosaceae) em Timbó-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p.1015-1018, 2011.

MORETI, A. C. C. C. et al. Observações sobre a polinização entomófila da cultura da soja (*Glycine max* Merrill). **Boletim da Indústria Animal**, v. 55, n. 1, p.91-94, 1999.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, v. 132, n. 3, p.1-15, 2000.

NASCIMENTO, W. M. et al. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p.494-498, 2012.

NRCS – National resources Conservation Service. Pollinators. Washington: USDA, 2008 Disponível em: http://www.nrcs.usda.gov__>. Acesso em 04.08.2016.

OLIVEIRA, J. E. M. de; NICODEMO, D.; OLIVEIRA, F. F. de. Contribuição da polinização entomófila para a produção de frutos de aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p.56-65, 2015.

OLIVEIRA, M. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **Acta Apicultura Brasil**, v. 3, n. 2, p.01-6, 14 2015.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. Cresce o uso de inseticidas biológicos na agricultura. **Revista Grãos Brasil**, p.1-14, 2014.

PARANÁ. **Paraná é o segundo produtor nacional de mel.** 2009. Disponível em: <http://www.parana-online.com.br/editoria/economia/news/418233/?noticia=PARANA+E+O+SEGUNDO+PRODUTOR+NACIONAL+DE+MEL>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

PARRA, J.R.P. et al. **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores.** São Paulo: Editora Manole, 2002. 626p.

PENTEADO, S.R. **Defensivos Alternativos e Naturais.** 3.ed. Campinas, SP: Livros Via Orgânica, 2007.

PETTIS, J. S. et al. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. **Naturwissenschaften**, v. 99, n. 2, p.153-158, 2012.

POLANCZYK, R. A. et al. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, n. 1, p.18-27, 2003.

POTTS, S. et al. **Status and trends of European pollinators: Key findings of the STEP project.** Sofia: Pensoft Publishers, 2015. 76 p.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. de. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista científica eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 10, p.1-21, 2007.

RINDERER, T. E.; P., B.; SHEPPARD, W. S. Africanized Bee in the United States. **Scientific American**, v. 269, n. 6, p.52-58, 1993.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas.** 2ª ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 269p.

ROSA, A. de S.; BLOCHTEIN, B.; LIMA, D. K. Honey bee contribution to canola pollination in Southern Brazil. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p.255-259, 2011.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. 7 ed. São Paulo: Editora Roca. 2005. 1145 p.

SANFORD, M. T.. **Pollination of Citrus by Honey Bees**. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/AA/AA09200.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

SCHNEIDER, C. W. et al. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **Plos one** , v. 7, p. 1-9, 2012.

SEBRAE. **Oportunidades para o mercado do mel**. 2014. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae_2014/Estudos_e_Pesquisas/2014_06_06_RT_Agronegócio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2015.

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Versão definitiva do levantamento da produção rural paranaense por município**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/RelMunicipal20152versao.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

SEELEY, T. D. Adaptive Significance of the Age Polyethism Schedule in Honeybee Colonies. **Behavioral Ecology And Sociobiology**, v. 11, n. 4, p.287-293, 1982.

SILVA, A. B. da; BRITO, J. M. de. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p.248-258, 2015.

STABENTHEINER, A.; KOVAC, H.; BRODSCHNEIDER, R.. Honeybee Colony Thermoregulation – Regulatory Mechanisms and Contribution of Individuals in Dependence on Age, Location and Thermal Stress. **Plos One**, v. 5, n. 1, p.1-13, 2010.

STRAUB, Lars et al. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1835, p.1-8, 2016.

SOUZA, M. T. et al Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, p. 43-49, 1999.

SOUZA, T. de. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SYDNEY, N. V.; GONÇALVES, R. B.; FARIA, L. R. R... Padrões espaciais na distribuição de abelhas *Euglossina* (Hymenoptera, Apidae) da região Neotropical. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, n. 43, p.667-679, 2010.

THANY, S. et al. Similar Comparative Low and High Doses of Deltamethrin and Acetamiprid Differently Impair the Retrieval of the Proboscis Extension Reflex in the Forager Honey Bee (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 6, n. 4, p.805-814, 2015.

1 **¹2 CAPÍTULO I - Efeito de diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis* na longevidade**
2 **de *Apis mellifera* L. africanizada**

3 TÍTULO RESUMIDO: Efeito de Bt sobre *Apis mellifera*

4
5 **RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três linhagens de *Bacillus*
6 *thuringiensis* (Bt) sobre a longevidade de operárias de *Apis mellifera* africanizada. Para isso
7 foram preparadas soluções, na concentração de 3×10^8 esporos.mL⁻¹ (dosagem comercial), para
8 cada linhagem de Bt (IPS 82, BR 81 e BR 147). Foram realizados três bioensaios:
9 pulverização sobre as abelhas, contato com superfície pulverizada e pasta Cândi incorporada
10 com Bt. As abelhas do bioensaio de Bt incorporado à alimentação foram submetidos à análise
11 histológica do mesêntero. A longevidade das operárias foi avaliada de uma até 120 horas
12 utilizando diferentes intervalos. Verificou-se que no teste de pulverização, as abelhas que
13 entraram em contato com a linhagem de Bt IPS 82 apresentaram redução de longevidade. No
14 teste de contato, a linhagem BR 147 reduziu a longevidade das abelhas. No teste de
15 alimentação, as três linhagens estudadas reduziram a longevidade das abelhas Bt IPS 82: 64,5
16 horas; Bt BR 81: 64,5 horas e Bt BR 147: 60,0 horas. A linhagem Bt BR 81 foi considerada a
17 mais seletiva, dentre as avaliadas, a *A. mellifera*, reduzindo a longevidade destas apenas
18 quando ingerida.

19
20 **Palavras-chave:** abelha africanizada, seletividade, bactéria entomopatogênica

21
22
23 **Effect of different *Bacillus thuringiensis* strains on the longevity of the *Apis mellifera* L.**
24 **africanized**

25
26 **ABSTRACT.** The objective of this work was to evaluate the effect of three strains of *Bacillus*
27 *thuringiensis* (Bt) on the longevity of Africanized *Apis mellifera* workers. For this, solutions
28 were prepared, at the concentration of 3×10^8 spores.mL⁻¹ (commercial dosage), for each Bt
29 lineage (IPS 82, BR 81 and BR 147). Three bioassays were performed: spraying on the bees,
30 contact with pulverized surface and Cândi paste incorporated with Bt. The bees of Bt bioassay
31 incorporated into the feeding were submitted to the histological analysis of the mesenteric.

¹ Este capítulo foi editado conforme as normas da revista: Acta Scientiarum Agronomy – APÊNDICE A

32 The longevity of the workers was evaluated from one to 120 hours using different intervals. It
33 was verified that in the spray test, the bees that came in contact with the line of Bt IPS 82
34 presented reduction of longevity. In the contact test, the BR 147 line reduced the longevity of
35 the bees. In the feeding test, the three lines studied reduced the longevity of Bt IPS bees 82:
36 64.5 hours; Bt BR 81: 64.5 hours and Bt BR 147: 60.0 hours. The Bt BR 81 strain was
37 considered the most selective, among those evaluated, to *A. mellifera*, reducing their longevity
38 only when ingested.

39

40 **Keywords:** bees, selectivity, entomopathogenic bacteria

41

42

43 INTRODUÇÃO

44

45 Dentro do grupo de bactérias entomopatogênicas utilizadas no controle biológico,
46 destaca-se *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Esta bactéria é utilizada como bioinseticida
47 para o controle de pragas agrícolas, em especial lagartas, nas culturas de tomate, algodão,
48 citros, mandioca, soja, trigo e milho (Angelo; Vilas-Bôas & Castro-Gómez, 2010 Bravo,
49 Likitvivatanavong, Gill & Soberón, 2011). Os micro-organismos entomotogênicos, como as
50 bactérias, necessitam ser testados antes de serem aplicados em campo, pois além dos insetos-
51 pragas, eles podem afetar organismos não-alvos, como os polinizadores (Gallo et al., 2002).
52 Dentre os polinizadores, destacam-se as abelhas africanizadas *Apis mellifera* L.
53 (Hymenoptera: Apidae).

54 A abelha *A. mellifera* é valorizada como polinizador de cultura comercial (Straub, et
55 al., 2016). Isso leva ao interesse na manutenção das colônias, principalmente em meios
56 agrícolas, pois contribui para o aumento da produção, atingindo uma alta taxa produtividade e
57 qualidade de sementes e frutos, além de realizarem a produção de mel, geleia real, própolis
58 (Viuda, Ruiz, Fernández & Alvarez, 2008; Rangberg, Diep, Rudi & Amdam, 2012; Marini,
59 Tamburini, Petrucco-Tofollo, Lindström, Zanetti, Mosca & Bommarco, 2015). Além disso, a
60 ausência dos agentes polinizadores acarreta em baixa produtividade de frutos, falta de
61 padronização quanto a forma, aspecto, sabor, tamanho e formato, o que pode gerar problemas no
62 rendimento e no lucro para o produtor (Cobra et al., 2015).

63 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (produto comercial Dipel[®] PM) mostrou-se tóxico
64 para adultos de *A. mellifera* em laboratório, tanto quando pulverizada sobre as operárias,

65 quanto em adição à pasta Cândi (Brighenti, Carvalho, Carvalho, Brighenti, & Carvalho,
66 2007).

67 No entanto *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) quando pulverizado via aérea não
68 afetaram o desempenho de crias da colônias de abelhas *A. mellifera* e não interferiram na
69 saúde da colônia e no comportamento das abelhas. Essas pulverizações também não acarretam
70 mudanças comportamentais da colônia, comparando o antes, durante e depois da pulverização
71 da cria (Lez, Llado, Petro & Alemany, 2014).

72 D'urso et al. (2016) verificaram que *B. thuringiensis* var. *aizawai* e *kurstaki* (linhagem
73 GC 91) (na dosagem recomendada pelo fabricante) não interferiu na sobrevivência de *A.*
74 *mellifera* e não provocou alterações morfoestruturais no intestino médio das operárias.

75 No entanto, com o surgimento de novos produtos à base de *B. thuringiensis* e com a
76 utilização de diferentes linhagens sobre insetos pragas, é essencial que as avaliações de
77 seletividade sejam constantemente realizadas para verificar a segurança desses produtos sobre
78 organismos não-alvos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três linhagens
79 de *B. thuringiensis* sobre a longevidade de operárias de *A. mellifera* africanizadas.

80

81 MATERIAL E MÉTODOS

82

83 O trabalho foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus de
84 Dois Vizinhos (UTFPR-DV), no Laboratório de Controle Biológico I e II e na Unidade de
85 Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE-Apicultura).

86

87 **OBTENÇÃO DE *Apis mellifera* E *Bacillus thuringiensis***

88

89 *Apis mellifera* africanizada: Os quadros contendo crias operculadas de operárias de 19
90 dias foram obtidas de colônias do apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) –
91 Apicultura. Posteriormente foram transportados para o Laboratório de Controle Biológico e
92 acondicionados em sacos de papel Kraft (gramatura 50), lacrados e perfurados, mantidos em
93 câmara climatizada tipo BOD ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$), por dois dias, a fim de obter-se a
94 emergência uniforme das operárias para a utilização nos bioensaios, simulando o ambiente da
95 colônia de origem. Para a alimentação de *A. mellifera*, utilizada nos bioensaios, foi utilizada
96 pasta Cândi, misturando 50 g de açúcar de confeitiro com 10 mL de mel puro, até formar
97 uma massa homogênea.

98 *Bacillus thuringiensis*: Foram utilizadas três linhagens desta bactéria, sendo elas: IPS
99 82, BR 81, e BR 147, obtidas da coleção de entomopatógenos do Laboratório de Genética e
100 Taxonomia de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina – UEL, identificados
101 pela presença de proteínas Cry tóxicas às espécies das ordens Coleoptera e Diptera. Essas
102 linhagens foram multiplicadas e quantificadas até obter a concentração de dosagem comercial
103 de $3,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹.

104 **BIOENSAIO 1: PULVERIZAÇÃO DE *B. thuringiensis* SOBRE *A. mellifera***

105
106 As operárias de *A. mellifera*, recém emergidas, foram anestesiadas, com CO₂, por 120
107 segundos, acondicionadas em placas de Petri e então pulverizadas com os tratamentos,
108 utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão
109 constante 1,2 kgf/cm. Em seguida, dez operárias foram transferidas para recipientes plásticos
110 (100mm X 120mm), sendo cada recipiente considerado uma repetição, totalizando seis
111 repetições por tratamento. Os recipientes foram vedados com tecido tipo *voil*, e sobre este foi
112 fornecido alimento constituído de pasta Cândia e um pedaço de algodão embebido em água
113 destilada.

114 A testemunha foi composta da pulverização de água deionizada esterilizada, e os
115 tratamentos a base de *B. thuringiensis* foram realizados na concentração de $3,0 \times 10^8$
116 esporos.mL⁻¹. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D ($34 \pm$
117 2°C , U.R. de $60 \pm 5\%$) e a mortalidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco;
118 seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 horas após a pulverização dos
119 agentes de controle (metodologia adaptada de Baptista, Carvalho, Carvalho, Carvalho &
120 Filho, 2009).

121

122 **BIOENSAIO 2: CONTATO DE *A. mellifera* COM SUPERFÍCIE PULVERIZADA** 123 **COM *B. thuringiensis***

124

125 Foram utilizadas placas de Petri de vidro, com 15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura,
126 cada placa foi pulverizadas com 290 µL da solução de uma das linhagens de *B. thuringiensis*.
127 O cálculo foi realizado com base na área da placa na qual a solução seria pulverizada. Para
128 isso, utilizou-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão
129 constante 1,2 kgf/cm. Posteriormente, essas placas foram dispostas em câmara de fluxo
130 laminar horizontal para a evaporação completa da água. Em seguida, as placas foram

131 montadas de forma que as bocas quase se encaixassem, permitindo o fluxo de ar (metodologia
132 adaptada de Carvalho, Carvalho, Carvalho, Bueno Filho, & Baptista, 2009).

133 Dez operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO₂, por 120 segundos,
134 foram inseridas no interior dessas placas, sendo cada placa considerada uma repetição,
135 totalizando seis repetições por tratamento. A testemunha foi composta da pulverização de
136 água deionizada esterilizada. Após duas horas de contato com os produtos, as abelhas foram
137 transferidas para recipientes plásticos, onde receberem pasta Cândi e um algodão embebido
138 em água. As condições experimentais, os parâmetros avaliados, bem como a análise dos
139 dados foram os mesmos descritos no Bioensaio 1.

140

141 **BIOENSAIO 3: PASTA CÂNDI INCORPORADA COM *B. thuringiensis***

142

143 Dez operárias recém emergidas de *A. mellifera* foram anestesiada com CO₂, por 120
144 segundos, e acondicionadas individualmente em um tubo de vidro de fundo chato (2,5 x
145 8,5cm). O tubo foi vedado com tecido tipo *voil*, e sobre este foi fornecido um pedaço de
146 algodão embebido em água destilada. Como alimento foi oferecido pasta Cândi acrescida de
147 *B. thuringiensis*. A dosagem de *B. thuringiensis* foi calculada em função da dosagem
148 recomendada para utilização em campo. Cada grupo de dez tubos foi considerado como uma
149 repetição, totalizando seis repetições por tratamento. A testemunha foi composta de pasta
150 Cândi pura. As condições experimentais, os parâmetros avaliados e a análise dos dados foram
151 os mesmos descritos no Bioensaio 1.

152 Oito operárias por tratamento foram selecionadas, aleatoriamente, para análise do
153 mesêntero. Para a retirada do mesêntero, quando necessário, o corpo das operárias foi dividido
154 em fragmentos, a fim de facilitar a preparação e qualidade das amostras. Essas amostras
155 foram retiradas e fixados em Fixador *Bouin* (250 mL de formaldeído 40% + 50 mL ácido
156 acético glacial PA + 750 mL de solução saturada de ácido pícrico 1,4%) por 4 h, lavadas em
157 álcool 70% (3 × 15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento.

158 As amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas por imersão em álcool de
159 diferentes concentrações, em metodologia histotécnica adaptada (álcool 80%: 10 minutos,
160 álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100%: 2 ×
161 30 minutos), sendo, posteriormente, diafanizadas por imersão em Xilol (Álcool/Xilol 1:1: 30
162 minutos; Xilol I: 30 minutos e Xilol II: 30 minutos). Na sequência foi realizada a
163 parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1: 30 minutos; Parafina Histológica I: 180

164 minutos e Parafina Histológica II: 15 minutos) e o emblocamento em Parafina Histológica
165 (Parafina Histológica/Cera de abelha 4:1).

166 O material emblocado foi cortado em Micrótomo Rotativo Manual, em cortes de 2 a 7
167 μm de espessura, montados em lâmina de vidro de ponta fosca para microscopia ($3,0 \times 10,0$
168 cm) contendo solução de albumina, sendo então assentados sobre chapa quente para distensão
169 dos cortes.

170 Os cortes foram corados pelo método H/E (Hematoxilina/Eosina), para isto foi
171 realizada a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 5
172 minutos, álcool 100% II: 5 minutos) e a reidratação destes (álcool 90%: 5 minuto, álcool
173 80%: 5 minuto, lavagem em água destilada corrente: (2 minutos). Para a coloração, os cortes
174 foram banhados em Hematoxilina (40 segundos), lavados em água corrente (10 minutos),
175 banhados em Eosina (10 segundos) e novamente lavados em água destilada corrente (10
176 segundos). Estes ficaram em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dois dias, para que os corantes secassem,
177 quando foram recobertos por lamínulas de vidro para microscopia ($2,3\text{ cm} \times 3,6\text{ cm}$) e fixados
178 com Bálsamo do Canadá.

179 As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio Biológico
180 Binocular de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando
181 uma objetiva de aumento de 40X. Foram comparados os tecidos do sistema digestório das
182 operárias de *A. mellifera* alimentados com pasta Cândi contendo *B. thuringiensis* com as
183 operárias de *A. mellifera* alimentados com pasta Cândi pura.

184

185 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

186

187 Os dados de longevidade das operárias de *A. mellifera* dos três bioensaios foram
188 submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Dunckan a
189 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat® (Silva & Azevedo 2002). Em
190 seguida foram elaborados gráficos de análise de sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier
191 com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0. ® (Ayres, Ayres Júnior, Ayres & Santos,
192 2007).

193

194 RESULTADOS

195

196 No bioensaio de pulverização de *B. thuringiensis* sobre *A. mellifera* verificou-se que
 197 apenas a linhagem Bt 1 (IPS 82) causou redução da longevidade (88,7 horas) quando
 198 comparada à testemunha (104,72 horas). As demais linhagens, Bt 2 (BR 81) e Bt 3 (BR 147),
 199 não provocaram alterações na longevidade das operárias de *A. mellifera* (Tabela 1 e Figura 1)
 200

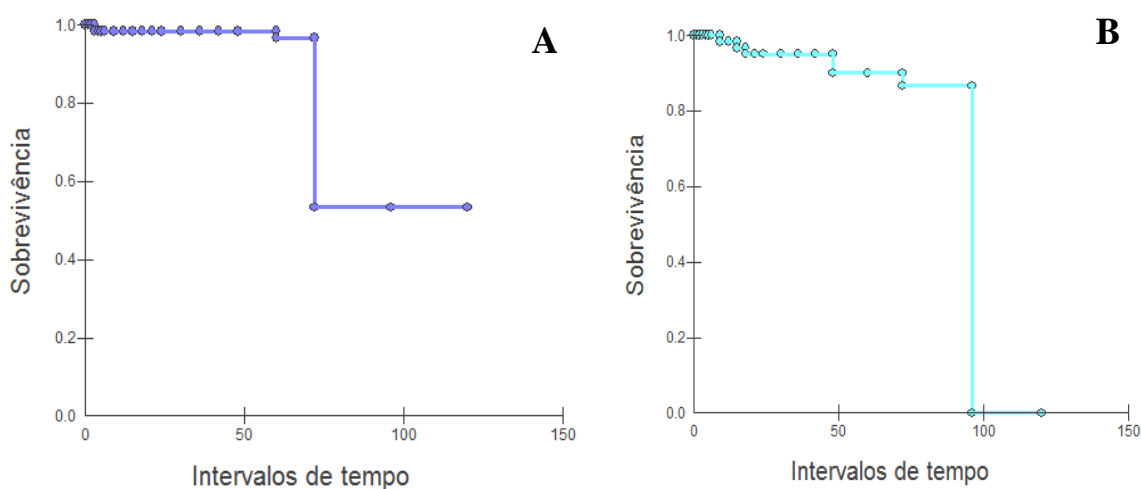
201 **Tabela 1.** Longevidade média (em horas) \pm EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após
 202 serem submetidas a três bioensaio com *B. thuringiensis*. Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm$
 203 5%).

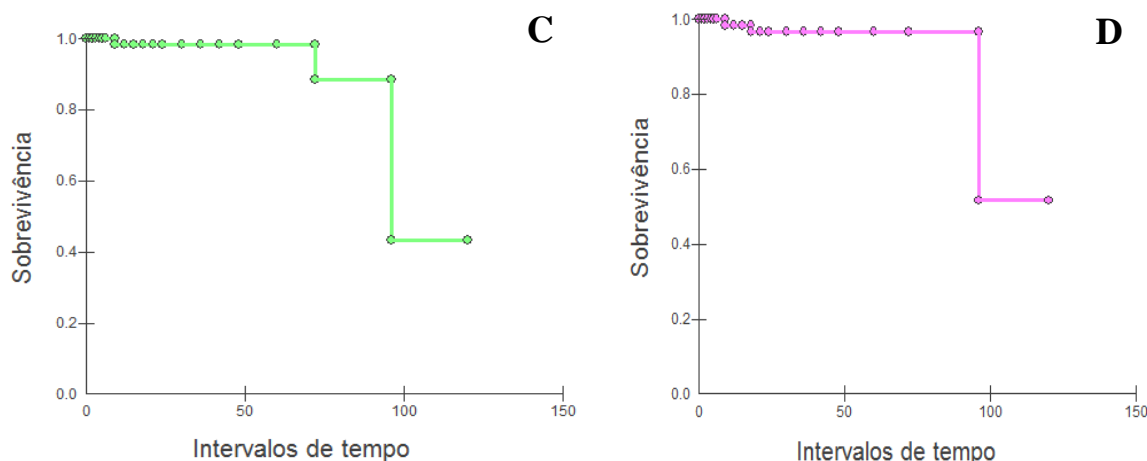
Bioensaio	Tratamento	Longevidade média (horas)
Bioensaio 1: Pulverização de Bt sobre <i>A. mellifera</i>	Testemunha	$104,7 \pm 2,99$ a
	Bt 1 (IPS 82)	$88,7 \pm 2,66$ b
	Bt 2 (BR 81)	$102,5 \pm 2,57$ a
	Bt 3 (BR 147)	$105,6 \pm 2,70$ a
<i>p</i> valor		$p < 0,01$
Bioensaio 2: Contato de <i>A. mellifera</i> em superfície tratada com Bt	Testemunha	$118,4 \pm 0,78$ a
	Bt 1 (IPS 82)	$111,6 \pm 3,30$ a
	Bt 2 (BR 81)	$117,8 \pm 1,79$ a
	Bt 3 (BR 147)	$101,2 \pm 4,19$ b
<i>p</i> valor		$p < 0,01$
Bioensaio 3: Pasta cãndi incorporada com Bt	Testemunha	$90,5 \pm 4,98$ a
	Bt 1 (IPS 82)	$64,5 \pm 4,41$ b
	Bt 2 (BR 81)	$64,5 \pm 5,41$ b
	Bt 3 (BR 147)	$60,0 \pm 3,72$ b
<i>p</i> valor		$p < 0,01$

204 Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do
 205 teste de Duncan em nível de 95% de credibilidade. EP: Erro Padrão

206

207





208

209 **Figura 1.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas), após
 210 pulverização de três linhagens de *Bacillus thuringiensis*, sobre operárias adultas de *Apis*
 211 *mellifera* A) Testemunha, B) Bt 1 - IPS 82, C) Bt 2 - BR 81 e D) Bt 3 - BR 147. Temperatura
 212 ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.

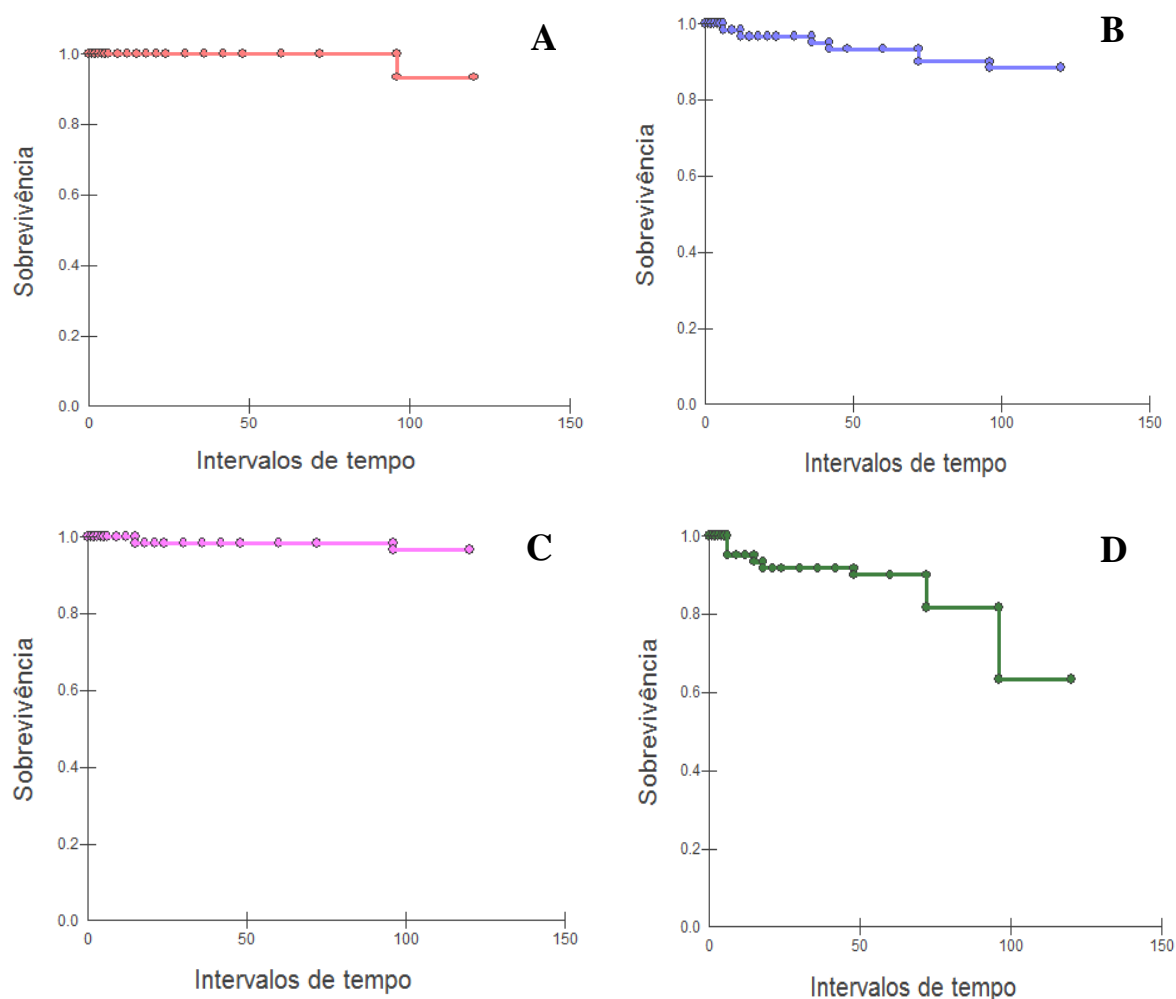
213 Observando a Figura 1 verificou-se que as operárias provenientes do tratamento
 214 testemunha e Bt 3 – BR 147 apresentaram 51,67% de sobrevivência ao final das 120 horas do
 215 experimento, além disso, Bt 2 (43,34% de sobrevivência) não diferiu da testemunha (51,67%
 216 de sobrevivência) após as 120 horas de análise. As operárias proveniente do tratamento Bt 1 -
 217 IPS 82, ao final de 96 horas, apresentaram 100% de mortalidade, diferindo dos demais
 218 tratamentos.

219 No Bioensaio 2, de contato de *A. mellifera* com superfície pulverizada com Bt, apenas
 220 a linhagem Bt 3 – BR147 causou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* (101,2
 221 horas) em relação a testemunha (118,4 horas) (Tabela 1). As outras linhagens (Bt 1 – IPS 82:
 222 111,6 horas e Bt 2 – BR 81: 117,8 horas) não apresentaram diferenças quanto a longevidade
 223 das operárias, conforme Tabela 1 e Figura 2. Ao final das 120 horas de análises, 63,33% das
 224 operárias de *A. mellifera*, provenientes da linhagem Bt 3 – BR 147 estavam vivas, diferindo
 225 das linhagens Bt 1 – IPS 82 (88,33%), e a BT 2 – BR 81 (96,67%), e da testemunha (93,33%)
 226 conforme (Figura 2).

227 No bioensaio de contato, a linhagem de *B. thuringiensis* Bt 3 - BR 147 diminuiu a
 228 longevidade das operárias. Embora não tenham estudos sobre o contato de *A. mellifera* com a
 229 bactéria *B. thuringiensis*, no presente trabalho foi possível verificar que uma das linhagens
 230 estudadas apresentou efeito negativo. Apesar de *B. thuringiensis* não agir por contato, apenas
 231 por ingestão, a contaminação pode ter ocorrido, pois os insetos sociais, incluindo as abelhas
 232 *A. mellifera* jovens apresentam o hábito de higiene, na qual uma abelha limpa o tegumento da
 233 outra, e isso pode fazer com que elas acabem ingerindo os esporos da bactéria que estão sobre

234 o seu corpo ou de outra operária provocando alterações (Brighenti et al., 2007; Triplehorn, &
 235 Johnson, 2011.) levando à mortalidade logo após a pulverização e/ou contato.

236



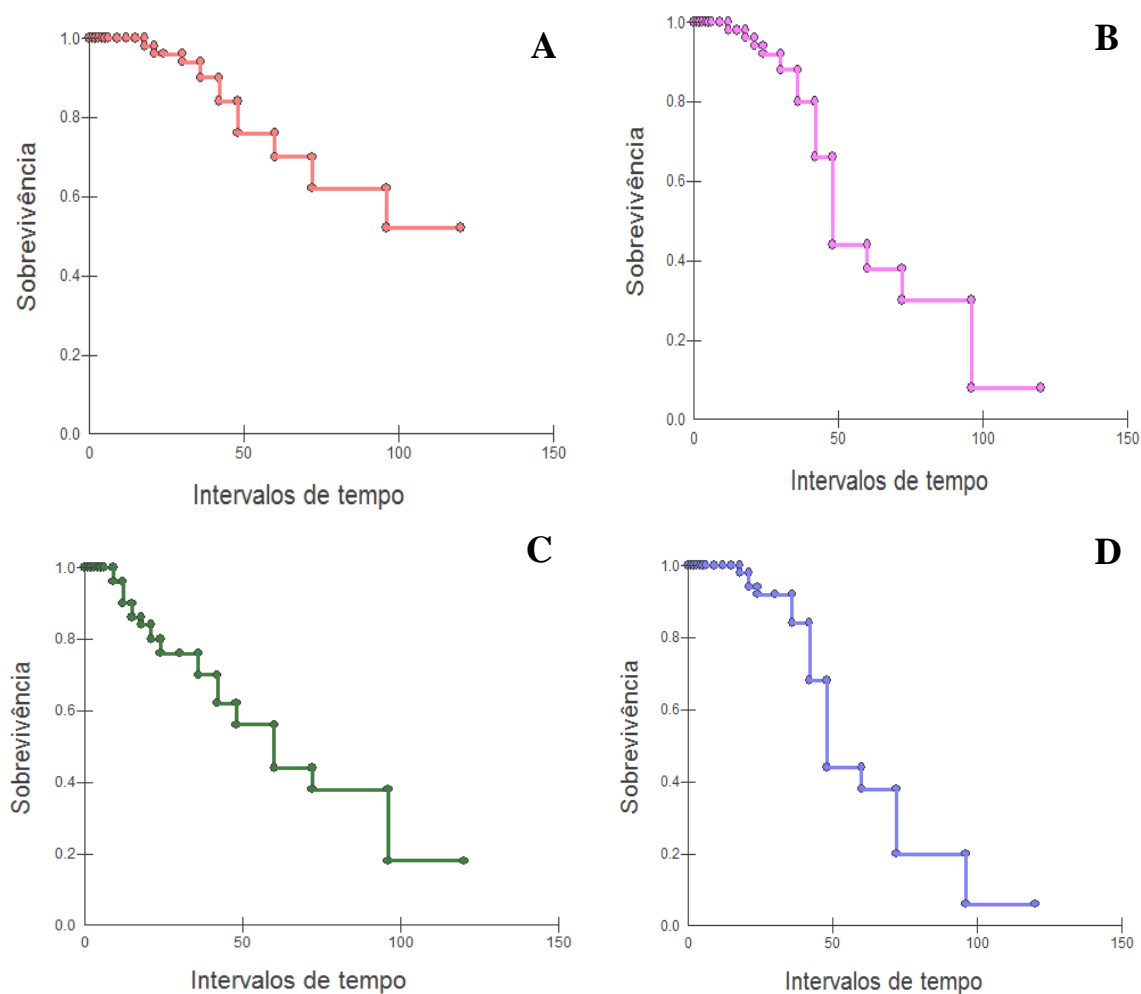
237

238 **Figura 2.** Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato
 239 em placa de Petri de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes linhagens de
 240 *Bacillus thuringiensis*. A) Testemunha, B) Bt 1 - IPS 82, C) Bt 2 - BR 81 e D) Bt 3 - BR 147
 241 Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.

242

243 Todas as linhagens de *B. thuringiensis* avaliadas, quando incorporadas à alimentação
 244 de *A. mellifera* (Tabela 1), reduziram a longevidade das operárias (Bt 1 – IPS 82: 64,5 horas;
 245 Bt 2 – BR 81: 64,5 horas e Bt 3 – BR 147: 60,0 horas) em relação à testemunha - 90,5 horas
 246 (Tabela 1, Figura 3). As três linhagens estudadas reduziram a sobrevivência das operárias. Ao
 247 final das 120 horas apenas 10% das operárias provenientes da linhagem Bt 1 – IPS 82
 248 estavam vivas, já Bt 2 – BR 81 estava com 18% e Bt 3 – BR 147 com 6% de operárias vivas,
 249 enquanto a testemunha apresentava 52% de operárias vivas (Figura 3).

250



251

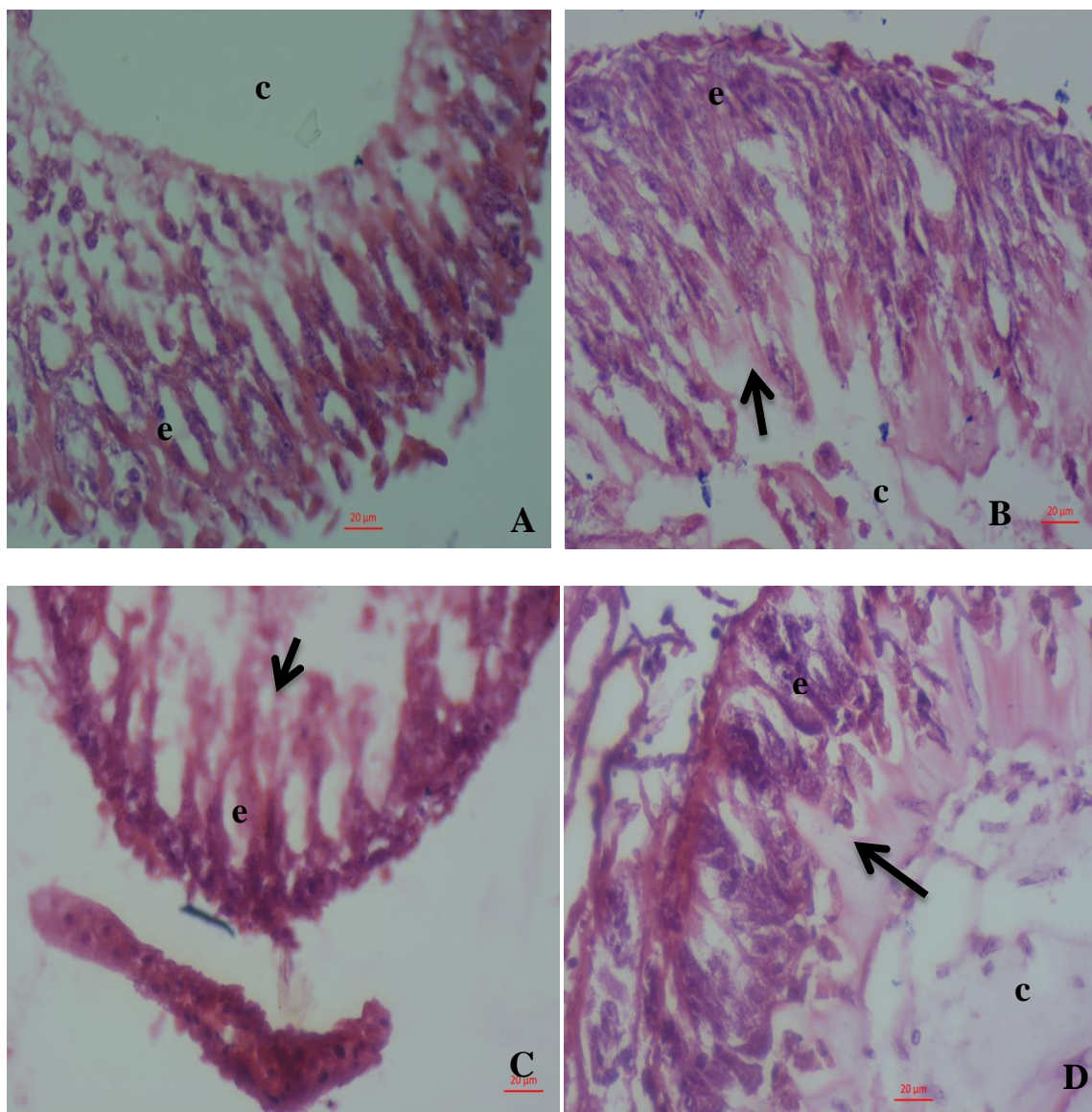
252 **Figura 3.** Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após
 253 alimentação de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes linhagens de *Bacillus*
 254 *thuringiensis*. A) Testemunha, B) Bt 1 - IPS 82, C) Bt 2 - BR 81 e D) Bt 3 - BR 147.
 255 Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.

256

257 A histologia do mesêntero das operárias de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi e
 258 as três linhagens de *B. thuringiensis* demonstraram os mesênteros desintegrados, com células
 259 disformes quando comparados às células do mesêntero de operárias alimentadas com pasta
 260 Cândi pura (Figuras 4A, B, C e D) A organização celular geral, em forma de criptas, pode ser
 261 observada na Figura 4A, enquanto nas Figuras 4B, C e D esta organização não é observável.

262

263



264 **Figura 4.** Fotomicrografia do mesêntero de *Apis mellifera* (Microscópio Biológico Binocular
 265 de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva
 266 de aumento de 40X). Abelhas operárias alimentadas com: A) Pasta cândi pura; B) Pasta cândi
 267 + Bt 1 – IPS 82, C) Pasta cândi + Bt 2 – BR 81, D) Pasta cândi + Bt 3 – BR 147. O epitélio de
 268 revestimento de mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com
 269 diferentes linhagens de Bt apresentou desestruturação (setas), pois as células epiteliais do
 270 intestino médio das abelhas assemelham-se a uma cripta, sendo dispostas de forma
 271 concêntrica, localizadas quase paralelas uma da outra. Tanto a cripta quanto as células
 272 epiteliais apresentam uma simetria radial, existem algumas células que ainda não estão em
 273 contato com o lúmen, estas são células colunares maduras de estádios de desenvolvimento
 274 sucessivos e células endócrinas (Raes, Verbeke, Meulemans, & Costers, 1994; Cruz-Landim,
 275 2009). e = Epitélio de revestimento; c = Cavidade do mesêntero.

276

277 DISCUSSÃO

278

279

280

Os bioensaios de contato e pulverização direta não influenciaram na longevidade das operárias de *A. mellifera* tanto quanto o bioensaio de ingestão (Bt incorporado à pasta cândi),

281 isto ocorre, pois *B. thuringiensis* atua quando ingerido, através dos cristais que esta bactéria
282 produz. Por este motivo quando as abelhas se alimentam com pasta cãndi que contém as
283 linhagens da bactéria, a longevidade delas é reduzida.

284 No entanto, algumas linhagens, como IPS 82 (utilizada neste trabalho) podem
285 provocar redução na longevidade de operárias de *A. mellifera*. O mesmo foi observado
286 quando *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (produto comercial Dipel® PM - concentração de 0,5
287 g/100 mL – dosagem comercial), quando pulverizado sobre operárias adultas de *A. mellifera*,
288 causou mortalidade significativa em 52,4% das abelhas ao final de 96 horas de experimento
289 (Brighenti et al., 2007).

290 Subdosagens de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1 (em *Trichogramma*
291 *pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), influenciaram negativamente a biologia deste
292 parasita, reduzindo a porcentagem e a capacidades de parasitismo (Bortoli et al., 2012), o
293 mesmo ocorreu com *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) pulverizado com *B.*
294 *thuringiensis* (produto comercial Dipel® PM) (Silva, Andrade, Stecca, Bueno, Neves, &
295 Moscardi, 2013).

296 No bioensaio de alimentação, com pasta Cãndi incorporada com *B. thuringiensis*, as
297 três linhagens provocaram redução da longevidade das abelhas. Acredita-se que isso ocorreu
298 porque o modo de ação de *B. thuringiensis*, que é uma bactéria gram positiva, é por ingestão.
299 Ela apresenta cristais como princípio ativo e no aparelho digestivo do inseto o cristal
300 produzido por esta bactéria encontra condição ideal (pH alcalino) para ser dissolvido e
301 absorvido, transformando-se em substância tóxica (fragmentos de 60-65 kDa). As células
302 epiteliais das vilosidades do intestino médio do inseto reconhecerão os receptores específicos
303 que induzirão à formação de poros na membrana do epitélio, permitindo o extravasamento do
304 líquido digestivo destruição das microvilosidades, desenvolvimento ou crescimento excessivo
305 das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e ruptura ou dissolução da membrana
306 plasmática, levando o inseto a paralisia e morte (Alves, 1998; Habid & Andrade, 1998;
307 Maagd, Bravo, & Crickmore, 2001).

308 Operárias adultas de *A. mellifera*, alimentadas com *B. thuringiensis* (produto
309 comercial Dipel® PM - na concentração comercial 0,5 g), incorporado na pasta Cãndi após 96
310 horas, apresentaram 57% de mortalidade (Brighenti et al., 2007). Foi verificado que nas
311 primeiras horas essas abelhas rejeitaram o alimento, com grande fluxo de fezes derretidas,
312 causadas por distúrbios intestinais, perda de agilidade, isolamento durante a noite, além de
313 paralisia geral antes de morrer (Brighenti et al., 2007)

314 A pulverização aérea de Bt não provocou alterações no desenvolvimento de
315 ninhadas/crias de *A. mellifera*. Ou seja, não houve mudanças no desempenho das colônias
316 (Lez, Llado, Petro & Alemany, 2014).

317 No entanto, operárias de *A. mellifera ligustica* e *A. cerana cerana* não foram afetadas
318 quando ingeriram a toxina Cry1Ah (presente no milho transgênico Bt), misturada em xarope
319 de açúcar, o qual também não interferiu no consumo de pólen e na massa da glândula
320 hipofaríngea (Dai et al., 2011).

321 Apesar de não verificar mudanças aparentes nas abelhas, os esporos Bt Cry podem
322 induzir a modificações fisiológicas modulando diferencialmente atividades enzimáticas. Ou
323 seja, uma aparente ausência de toxicidade pode esconder interrupções fisiológicas que
324 poderiam ser prejudiciais para as abelhas, especialmente no caso de exposições combinadas a
325 outros estressores ambientais ou a super-dosagens (Renzi et al., 2016).

326 Poucos minutos após a ingestão de *B. thuringiensis*, começam a ocorrer ações
327 histopatológicas nas microvilosidades do intestino médio e, dependendo do inseto, em poucas
328 horas ocorre a desintegração extensiva das células epiteliais do intestino (Habid; Andrade,
329 1998), conforme descrito anteriormente. O que pode levar a morte dos insetos por essas
330 condições.

331 As diferentes linhagens de *B. thuringiensis* produzem toxinas e substâncias com ações
332 específicas, sendo as mais importantes: a δ -endotoxina ou toxina do cristal, sendo o alvo
333 inicial o epitélio do intestino médio, no qual as toxinas em contato com as células do epitélio
334 causam um desequilíbrio osmótico que leva a parada na alimentação e, mais tarde, ocasiona a
335 parada intestinal e a β -exotoxina (thuringiensina) toxina fatal para os insetos, causando a
336 morte em espécies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera
337 (Habid & Andrade, 1998).

338 Verifica-se que no bioensaio de alimentação, as três linhagens interferiram na
339 longevidade das abelhas, e isso aconteceu provavelmente porque *B. thuringiensis* age no
340 momento em que é ingerido pelo inseto, aumentando a mortalidade dos mesmos. Mas, como
341 os agricultores pulverizam os produtos a base de Bt na lavoura, testes em semi-campo e
342 campo podem ser realizados para avaliar a longevidade de operárias de *A. mellifera* e
343 considerando demais fatores ambientais.

344 Nessas condições (em campo) as abelhas podem entrar em contato com esses produtos
345 em três modos diferentes em em um mesmo forrageamento: 1) sendo pulverizadas pelo
346 produto, 2) entrando em contato com plantas já pulverizadas e 3) durante a coleta de néctar e
347 pólen, introduzir a bactéria via oral. Porém, no campo, fatores bióticos (predadores, plantas

348 daninhas, etc) e abióticos (chuva, vento, temperatura, etc) interferem no contato das abelhas
349 com os produtos, podendo, facilmente, minimizar os efeitos causados pelas aplicações de *B.*
350 *thuringiensis*.

351 Cada linhagem possui características específicas que devem ser analisadas
352 molecularmente (PCR) e testadas quanto ao efeito em campo, como exemplo da linhagem Bt
353 3 - BR 147, isolada do Brasil, que apresenta atividade inseticida, devido à identificação de 12
354 regiões codificantes, localizadas em dois plasmídeos, que codificam proteínas inseticidas
355 (Barbosa et al., 2015).

356

357 **CONCLUSÃO**

358

359 As três linhagens de *B. thuringiensis* (IPS 82, BR 81 e BR 147) reduziram a
360 longevidade de operárias de *A. mellifera* africanizada quando incorporadas a pasta Candi,
361 ocasionando desintegração das células epiteliais do mesêntero. As linhagens IPS 82 e BR 147
362 também reduziram a longevidade de operárias de *A. mellifera* africanizada no bioensaio de
363 pulverização e contato em superfície vítrea, respectivamente.

364

365 **REFERÊNCIAS**

366

367 Alves, S. B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. 2ª ed. São Paulo, SP: Fealq.

368

369 Angelo, E. A., Vilas-Bôas, G. T. & Castro-Gómez, R. J. H. (2010) *Bacillus thuringiensis*:
370 características gerais e fermentação. *Semina: Ciências Agrárias*, 31 (4), 945-958.

371

372 Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L. & Santos, A. A. (2007). *BIOESTAT: Aplicações*
373 *estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua*. Belém, PA.

374

375 Baptista, A. P. M., Carvalho, G. A., Carvalho, S. M., Carvalho, C. F., & Filho, J. S. S. B.
376 (2009). Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*.
377 *Ciência Rural*, 39 (4), 955-961.

378

- 379 Barbosa, L. C. B., Farias, D. L., Silva, I. de M. G., Melo, F. L., Ribeiro, B. M. & Aguiar, R.
380 W. de S. (2015) Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* 147, a Brazilian strain with
381 high insecticidal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110 (6), 822-823.
382
- 383 Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A
384 story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41 (7), 423-
385 431.
386
- 387 Brighenti, D. M., Carvalho, C. F., Carvalho, G. A., Brighenti, C. R. G., & Carvalho, S. M.
388 (2007). Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de
389 *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Ciência e Agrotecnologia*, 31 (2),
390 279-289.
391
- 392 Bortoli, S. A. de, Vacari, A. M., Magalhães, G. O., Dibelli, W., Bortoli, C. P. de, & Alves,
393 M. P. (2012). Subdosagens de *Bacillus thuringiensis* em *Plutella xylostella* (Lepidoptera:
394 Plutellidae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: trichogrammatidae). *Revista*
395 *Caatinga*, 25 (2), 50-57.
396
- 397 Carvalho, S. M., Carvalho, G. A., Carvalho, F. C., Bueno Filho, J. S. S., & Baptista, A. P. M.
398 (2009). Toxicidade de Acaricidas/Inseticidas empregados na Citricultura para a abelha
399 africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arquivos do Instituto Biológico*,
400 76 (4), 597-606.
401
- 402 Cobra, S. S. O., Silva, C. A., Krause, W., Dias, D. C., Karsburg, I. V. & Miranda, A. F.
403 (2015). Características florais e polinizadores na qualidade de frutos de cultivares de
404 maracujazeiro-azedo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50 (1), 54-62.
405
- 406 Cruz-Landim, C. da. (2009) *Abelhas: Morfologia e função dos sistemas*. São Paulo, SP:
407 UNESP.
408
- 409 Dai, P. L., Zhou, W., Zhang, J., Jiang, W. Y., Wang, Q., Cui, H. J., Sun, J. H., Wu, Y. Y., &
410 Zhou, T. (2011). The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera*
411 *ligustica* and *Apis cerana cerana*). *Apidologie*, 43 (4), 384-391
412

- 413 D'urso, V., Mazzeo, G., Vaccalluzzo, V., Sabella, G., Bucchieri, F., Viscuso, R., & Vitale, D.
414 G. M. (2016). Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea)
415 under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. *Apidologie*,
416 1-12.
- 417
- 418 Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, C.G., Berti-Filho, E., &
419 Omoto, C. (2002). *Entomologia Agrícola*, Piracicaba SP: FEALQ.
- 420
- 421 Habid, M. E. M., & Andrade, C. F. S. (1998). Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S. B. (
422 2 ed), *Controle microbiano de insetos* (p. 383-446) Piracicaba, SP: FEALQ.
- 423
- 424 Lez, M. del M., Llado, G., Petro, A. B., & Alemany, A.(2014). First field assessment of
425 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis*
426 *mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Spanish Journal Of Agricultural Research*, 12 (2), 405-
427 408.
- 428
- 429 Maagd, R. A. de, Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved
430 specific toxins to colonize the insect world. *Trends In Genetics*, 17 (4), 193-199.
- 431
- 432 Marini, L. Tamburini, G. Petrucco-Tofollo, E. Lindström, S. A. M. Zanetti, F. Mosca, G., &
433 Bommarco, R. (2015). Crop management modifies the benefits of insect pollination in oilseed
434 rape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 207, 61-66.
- 435
- 436 Raes, H., Verbeke, M., Meulemans, W., & Costers, W. de. (1994). Organisation and
437 ultrastructure of the regenerative crypts in the of the adult worker honeybee *Apis mellifera*).
438 *Tissue And Cell*, 26 (2), 231-238.
- 439
- 440 Rangberg, A., Diep, D. B., Rudi, K., & Amdam, G. V. (2012). Paratransgenesis: An
441 Approach to Improve Colony Health and Molecular Insight in Honey Bees (*Apis mellifera*)?
442 *Integrative And Comparative Biology*, 52 (1), 89-99.
- 443
- 444 Renzi, M. T., Amichot, M., Pauron, D., Tchamitchian, S., Brunet, J. L., Kretzschmar, A.,
445 Maini, & S., Belzunces, L. P. (2016) Chronic toxicity and physiological changes induced in

446 the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or
447 combined. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 127, 205-213.

448

449 Silva, D. M., Andrade, A., Stecca, C. dos S., Bueno, A. de F., Neves, P. M. O. J., & Moscardi,
450 F. (2013). Compatibilidade de entomopatógenos com *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera:
451 Platygastridae). In: SINCONBIOL, 13, *Anais*.

452

453 Silva, F. de A. & S.; Azevedo, C. A. V. de. (2002) Versão do programa computacional
454 Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*,
455 4 (1), 71-78.

456

457 Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L.,
458 Khongphinitbunjong, K., Retschnig, G., ... Williams, G. R. (2016) Neonicotinoid insecticides
459 can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proceedings Of The Royal Society B:*
460 *Biological Sciences*, 283 (1835), 1-8.

461

462 Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. (2011). *Estudo dos insetos*: tradução da 7ª edição de Borror
463 and DeLong's introduction to the study of insects. São Paulo, Cengage Learning, 809p.

464

465 Viuda, M., Ruiz, Y., Fernández, J., & Alvarez, J. A. A. (2008) Functional properties of honey,
466 propolis, and royal jelly. *Journal Of Food And Science*, 73 (9), 117-124.

467

468

²³ CAPÍTULO II - EFEITO DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA (*Glycine max* L.) SOBRE A LONGEVIDADE DE *Apis mellifera* L.

Resumo

As abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L., estão desaparecendo de vários locais e acredita-se que seja devido ao intenso uso de produtos fitossanitários sintéticos (PFS), poluição e alterações climáticas. O declínio das populações de abelhas tem consequências diretas na produção de alimentos, principalmente porque a agricultura está diretamente ligada à ação desses importantes polinizadores. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três PFS (Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; Imidacloporido + Beta-Ciflutina e Fenitrotiona + Esfenvalerato), sobre operárias adultas de *A. mellifera*. 1) As soluções dos PFS foram pulverizadas em placas de Petri, posteriormente deixadas em fluxo laminar para secar, sendo então colocadas 10 abelhas em cada placa, as quais permaneceram por duas horas. Após as duas horas, as abelhas foram transferidas para recipientes plásticos. 2) As mesmas soluções foram pulverizadas sobre as abelhas, em seguida estas foram transferidas para recipientes plásticos. Nos dois bioensaios a testemunha foi composta por água deionizada esterilizada e foram fornecidos, para as abelhas, pasta Cândi e um algodão embebido em água. 3) As mesmas soluções foram misturadas a pasta Cândi e foi fornecido as abelhas. Todos os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada tipo BOD ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$) e a longevidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72; 96; e 120 horas. Verificou-se no bioensaio 1 que os três PFS interferiram na longevidade das abelhas, pois ao final das duas horas iniciais de contato, todas as abelhas estavam mortas. No bioensaio 2 os três PFS não diferiram entre si, reduzindo a longevidade das operárias para 1 hora (Acetamiprido + Alfa-cipermetrina e Imidacloporido + Beta-Ciflutina) e 2 horas (Fenitrotiona + Esfenvalerato). No bioensaio 3 os PFS 1, 2 e 3 reduziram a longevidade das abelhas para 22,0 horas, 21,7 horas e 43,9 horas, respectivamente, e diferiram da testemunha, 90,5 horas. Os três PFS avaliados não foram considerados seletivos para operárias de *A. mellifera*, segundo os testes realizados.

Palavras-chave: Abelha africanizada, Seletividade, Inseticida

Abstract

Africanized bees, *Apis mellifera* L., are disappearing from various locations and are believed to be due to the intensive use of synthetic pesticides (PFS), pollution and climate change. The decline of bee populations has direct consequences on food production, mainly because agriculture is directly linked to the action of these important pollinators. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of three PFS (acetamiprid + alpha-cypermethrin, Imidacloporide + Beta-Cyflutin and Fenitrothione + Esfenvalerate) on adult workers of *A. mellifera*. 1) PFS solutions were sprayed onto Petri dishes, then left in laminar flow to dry, and 10 bees were placed on each plate, which remained for two hours. After two hours, the bees were transferred to plastic containers. 2) The same solutions were sprayed onto the bees, then these were transferred to plastic containers. In the two bioassays the control was composed of sterilized deionized water and a Cândi paste and a cotton soaked in water were supplied to the bees. 3) The same solutions were mixed in the Cândi paste and the bees were formed. All the bioassays were kept in a BOD type chamber ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ U.R) and the workers' longevity was evaluated at one; Two; three; four; five; six; nine; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72; 96; And 120 hours. It was verified in the bioassay 1 that the three PFS interfered in the longevity of the bees, because at the end of the two initial hours of contact, all the bees were dead, while the bees from the control treatment showed longevity of 118.4 hours. In the bioassay 2 the three PFS did not differ, reducing the workers' longevity to 1 hour (Acetamiprid + Alpha-cypermethrin and Imidacloporide + Beta-Cyflutin) and 2 hours (Fenitrothione + Esfenvalerate). In the bioassay 3 the PFS 1, 2 and 3 reduced the longevity of the bees to 22,0 hours, 21,7 hours and 43,9 hours, respectively. The three evaluated PFS are not selective for *A. mellifera* workers, according to the tests performed.

² Este capítulo foi formatado conforme as normas da revista: Semina: Ciências Agrárias – APÊNDICE B

Keywords: Africanized bee, Selectivity, Insecticide

Introdução

O interesse na manutenção das abelhas, principalmente em meios agrícolas, ocorre por serem importantes organismos polinizadores, o que contribui para o aumento da produção, além de serem responsáveis pela produção de mel, geleia real, própolis e cera (SANFORD, 2003), estando direta ou indiretamente associadas aos humanos (BRASIL, 2003). Porém, a produção agrícola intensiva e o uso de produtos tóxicos nas culturas vem prejudicando cada vez mais as abelhas, diminuindo a densidade populacional, reduzindo a produção e contaminando as colônias (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

Estudos realizados com abelhas europeias, na maioria das vezes, expressam reações acentuadas destas aos produtos fitossanitários sintéticos, por serem organismos mais suscetíveis a esses produtos (DEVINE; FURLONG, 2007). A abelha *Apis mellifera* africanizada, no Brasil, não apresenta tantos estudos, por isso é importante a realização de trabalhos para que seja conhecida a interação destas com os produtos fitossanitários sintéticos (BAPTISTA et al., 2009), utilizados nos últimos anos.

Um dos produtos fitossanitários sintéticos utilizado é o composto Acetamiprido + Alfa-cipermetrina, um neonicotinoide e um piretroide que atuam como inseticida sistêmico e de contato, utilizados para percevejo-da-soja (*Euschistus heros* Fabr., 1974; Hemiptera: Pentatomidae), (AGROFIT, 2017). O acetamiprido afeta a aprendizagem das abelhas, diminuindo a capacidade de realização das atividades pelas operárias de *A. mellifera*, em especial as atividades determinadas por faixa etária dentro das colônias (THANY et al., 2015).

Outro produto utilizado frequentemente nas culturas anuais para o controle de *E. heros*, é o inseticida sistêmico composto por Imidacloprido (neonicotinoide) + Beta-ciflutrina (piretroide) (AGROFIT, 2017). Resíduos de piretroide e de inseticidas neonicotinoides foram encontrados em colmeias de abelhas *A. mellifera*, principalmente em grãos de pólen, e com o passar do tempo, a exposição e o contato das abelhas com esses produtos, acabou gerando prejuízos às colônias e às abelhas forrageiras como o desaparecimento delas de ambientes naturais (BAIO; KOICHI, 2014).

Inseticidas de contato e ingestão, do grupo químico dos organofosforados e piretroides (Fenitrothion + Esfenvalerato), também são utilizados para o controle de percevejos-da-soja (*E. heros*, *Nezara viridula* L. Hemiptera: Pentatomidae, *Piezodorus guildini* - West. Hemiptera: Pentatomidae) (AGROFIT, 2017). Porrini et al. (2016) realizaram um estudo sobre as causas de perdas de colônias de abelhas e do desaparecimento das mesmas e avaliaram que durante a primavera houve um impacto negativo nas colônia, pois nesta época as abelhas saem em busca das flores e há um aumento do uso de produtos químicos na agricultura (organofosforados e piretroides). Com isso, as abelhas entram em contato com esses produtos e acabam morrendo ou os levando para dentro das colmeias, aumentando a taxa de mortalidade da colônia.

Desta forma, destaca-se a importância do estudo constante do impacto dos produtos fitossanitários sintéticos liberados e utilizados na agricultura sobre organismos não-alvos. Ressalta-se ainda a necessidade maior de testar esses produtos e composições sobre *A. mellifera* africanizada pela destacada importância na polinização, e no setor apícola. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de três produtos

fitossanitários sintéticos utilizados para controle de insetos em culturas anuais, sobre operárias adultas da abelha africanizada, *A. mellifera*.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus de Dois Vizinhos (UTFPR-DV), no Laboratório de Controle Biológico I e II e na Unidade de Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE-Apicultura).

Obtenção de Apis mellifera e dos produtos fitossanitários sintéticos

Apis mellifera africanizada: Foram obtidos, de colônias do Apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) Apicultura, quadros de postura contendo crias operculadas de operárias *A. mellifera* africanizadas de 19 dias. Os quadros foram transportados para o Laboratório de Controle Biológico I e acondicionados em sacos de papel Kraft (gramatura 50), lacrados, perfurados e enrolados em tecido tipo *voil*, mantidos em câmara climatizada tipo BOD ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$), por dois dias. Esse procedimento foi realizado para que a emergência das operárias fosse uniforme para a utilização nos bioensaios, simulando o ambiente da colônia de origem. A alimentação das operárias de *A. mellifera* utilizada nos bioensaios foi realizada com pasta Cândi (50 g de açúcar de confeitiro + 10 mL de mel puro, até formar uma massa homogênea).

Produtos Fitossanitários sintéticos: Foram utilizados três produtos fitossanitários sintéticos, fornecidos por uma empresa de venda de insumos agrícolas de Dois Vizinhos (Tabela 1). Para todos os produtos foi preparada uma calda com a dosagem indicada pelo fabricante, e foi adicionado 290 μL em cada placa de petri. O cálculo foi realizado com base na área da placa na qual o líquido seria pulverizado.

Bioensaio 1. Pulverização de produtos fitossanitários sintéticos sobre A. mellifera

As operárias de *A. mellifera* recém emergidas foram anestesiadas, por 120 segundos, com CO_2 , acondicionadas em placas de Petri e então pulverizadas com as soluções dos tratamentos, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante 1,2 kgf/cm. Em seguida, dez operárias foram transferidas para recipientes plásticos (100mm X 120mm), sendo cada recipiente considerado uma repetição, totalizando seis repetições por tratamento. Os recipientes foram vedados com tecido tipo *voil*, e sobre este foi fornecido alimento constituído de pasta Cândi e um pedaço de algodão embebido em água destilada. A testemunha foi composta da pulverização de água deionizada esterilizada e cada tratamento foi composto por um dos produtos fitossanitários sintéticos, preparados conforme Tabela 1.

Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada tipo BOD ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$) e a mortalidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 horas após a pulverização dos produtos (BAPTISTA et al., 2009).

Bioensaio 2. Contato de A. mellifera com superfície pulverizada com produto fitossanitário sintético

Foram utilizadas placas de Petri de vidro, com 15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura, pulverizadas com o produto fitossanitário sintético, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante 1,2 kgf/cm. Posteriormente, essas placas foram dispostas em câmara de fluxo laminar horizontal para a evaporação completa dos líquidos.

Em seguida, as operárias recém emergidas foram anestesiadas com CO₂, por 120 segundos, e foram capturadas em grupos de 10 e alocadas nas placas de Petri previamente pulverizadas. As placas foram montadas de forma que as bocas quase se encaixassem, mas impedindo a passagem das operárias e permitindo o fluxo de ar (metodologia adaptada de CARVALHO et al., 2009).

Cada placa foi considerada uma repetição, totalizando seis repetições por tratamento. Na testemunha foi realizada a pulverização de água deionizada esterilizada. As condições experimentais, os parâmetros avaliados, bem como a análise dos dados foram os mesmos descritos no item Bioensaio 1. Pulverização de produtos fitossanitários sintéticos sobre *A. mellifera*

Bioensaio 3. Pasta cândi incorporada com produtos fitossanitários sintéticos

As operárias recém emergidas foram anestesiadas com CO₂ por 120 segundos, em seguida foram acondicionadas individualmente em um tubo de fundo chato de vidro (2,5 x 8,5cm), vedado com tecido tipo *voil*, e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada. A pasta Cândi foi incorporada com um produto fitossanitário sintético conforme cada tratamento. A testemunha foi composta de pasta Cândi pura. As condições experimentais, os parâmetros avaliados e a análise dos dados foram os mesmos descritos no item Bioensaio 1. Pulverização de produtos fitossanitários sintéticos sobre *A. mellifera*

Aleatoriamente, foram selecionadas oito operárias mortas por tratamento para análise histológica do mesêntero. Para isto, as amostras foram fixadas em Fixador *Bouin* (250 mL de formaldeído 40% + 50 mL ácido acético glacial PA + 750 mL de solução saturada de ácido pícrico 1,4%) por 4 h, lavadas em álcool 70% (3 x 15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento.

A desidratação das amostras foi realizada por imersão em álcool de diferentes concentrações (álcool 80%: 10 minutos, álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100%: 2 x 30 minutos), e diafanizadas por imersão em Xilol (Álcool/Xilol 1:1: 30 minutos; Xilol I: 30 minutos e Xilol II: 30 minutos), seguidos da parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1: 30 minutos; Parafina

Histológica I: 180 minutos e Parafina Histológica II: 15 minutos) e o emblocamento em Parafina Histológica (Parafina Histológica/Cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo Rotativo Manual, em cortes de 2 a 7 μm de espessura, montados em lâmina de vidro para microscopia (3,0 \times 10,0 cm) contendo solução de albumina, sendo então assentados sobre chapa quente para distensão dos cortes que permaneceram por uma noite em estufa a 35 °C, para secarem completamente

Os cortes foram corados pelo método H/E (Hematoxilina/Eosina), para isto foi realizada a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 5 minutos, álcool 100% II: 5 minutos), reidratação (álcool 90%: 5 minuto, álcool 80%: 5 minuto, lavagem em água destilada corrente: 2 minutos), banhados em Hematoxilina (40 segundos), água corrente (10 minutos), Eosina (10 segundos) e água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em estufa a 35 °C por dois dias, para que os corantes secassem, quando foram recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cm \times 3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio Biológico Binocular de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 40X. Foram comparados os tecidos das operárias de *A. mellifera* alimentados com pasta Cândi contendo os produtos fitossanitários sintéticos com as operárias de *A. mellifera* alimentados com pasta Cândi pura.

Análises estatísticas

Os dados de longevidade das operárias de *A. mellifera* dos três bioensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Dunckan a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat® (SILVA; AZEVEDO 2002). Em seguida foram elaborados gráficos de análise de sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0. ® (AYRES et al., 2007).

Resultados e Discussão

Os três produtos fitossanitários sintéticos, PFS 1 - Acetamiprido + Alfa-cipermetrina, PSF 2 - Imidacloporido + Beta-Ciflutina e PFS 3 - Fenitrothion + Esfenvalerato, reduziram a longevidade das operárias de *A. mellifera*, no bioensaio de pulverização direta (Tabela 2). As abelhas provenientes do tratamento PFS 1 e PFS 2 tiveram longevidade de uma hora, enquanto as provenientes do tratamento PFS 3 de 2,2, diferindo da longevidade das abelhas provenientes da testemunha (104, 7 horas) (Tabela 2 e Figura 1).

As operárias de *A. mellifera*, provenientes do tratamento testemunha, apresentaram 51,67% de sobrevivência ao final das 120 horas do experimento, já as operárias provenientes do tratamento PFS 1 e 2

apresentaram 100% de mortalidade ao final da primeira hora de análise. E as operárias do tratamento PFS 3 apresentaram 100% de mortalidade ao final de 6 horas (Figura 1).

No Bioensaio 2, as abelhas ficaram duas horas em contato com os produtos na placa de Petri, e em seguida seriam realocadas em recipientes plásticos. Porém, ao final das duas horas, 100% abelhas que entraram em contato com os três produtos fitossanitários sintéticos (PFS 1, PFS 2 e PFS 3) estavam mortas (Tabela 2) e com o aparelho bucal externalizado (APÊNDICE C), o que é uma característica que os insetos apresentam quando estão intoxicados. As abelhas que entraram em contato com a placa de Petri pulverizada com água deionizada esterilizada (testemunha) apresentaram longevidade de 118,4 horas, com 93,33% de sobrevivência ao final das 120 horas (Figura 2).

Os três produtos fitossanitários sintéticos avaliados, quando incorporados à alimentação de *A. mellifera*, reduziram a longevidade das operárias (PFS 1 – 22,0 horas, PFS 2 – 21,7 horas e PFS 3 – 43,9 horas) em relação à testemunha (90,5 horas) (Tabela 2).

Ao final de 60 horas de análise, as abelhas alimentadas com Pasta Cândi e PFS 1 e PFS 2 apresentaram 100% de mortalidade e ao final de 96 horas as abelhas alimentadas com Pasta Cândi e PFS 3, apresentaram 100% de mortalidade. Enquanto as abelhas que se alimentaram do tratamento testemunha apresentaram 52% de sobrevivência ao final das 120 horas de análise (Figura 3).

Nos três bioensaios o PFS 1 (Acetamiprido + Alfa-cipermetrina), o PFS 2 (Imidacloporido + Beta-Ciflutina) e o PFS 3 (Fenitrotiona + Esfenvalerato) provocaram redução significativa na longevidade das operárias de *A. mellifera*.

No bioensaio de pulverização direta, as abelhas que foram pulverizadas com os PFS 1 e PFS 2, após uma hora, tiveram 100% de mortalidade no presente trabalho. Em Carvalho et al. (2009) verificaram que uma hora após a pulverização de neonicotinoide e organofosforado foi constatado que tiveram mortalidade de 71% e 68% das operárias de *A. mellifera*, respectivamente, e nove horas após, 100% de mortalidade. Ainda no mesmo trabalho, as abelhas pulverizadas com piretroide não apresentaram valores significativos de mortalidade.

Tiametoxam, um neonicotinoide, e metidationa, um organofosforado, foram tóxicos às abelhas, causando mortalidade de em 56% das abelhas após uma hora (tiametoxam), e e em 76% das abelhas, após 4 horas (tiametoxam e metidationa) (CARVALHO et al., 2009).

Sementes de *Brassica napus* L. (Brassicaceae), popularmente conhecida como colza ou couve-nabiça, revestidas com um inseticida neonicotinoide (combinação de clothianidina e β -ciflutrina) acabou fazendo com que esse inseticida fosse absorvido sistemicamente pela planta e distribuído para todos os tecidos, desta forma, quando a abelha vai polinizar a flor ou entra em contato com a planta ela acaba por entrar em contato com o produto, afetando a atividade de nidificação da abelha solitária *Osmia bicornis* L., o desenvolvimento da colônia da abelha *Bombus terrestris* L. e a força de colônia da abelha europeia *A. mellifera*. (RUNDLÖF et al., 2015).

No bioensaio da alimentação, os três produtos fitossanitários sintéticos (Tabela 1) interferiram na sobrevivência das operárias adultas de *A. mellifera* (Tabela 2). O neonicotinoide tiametoxam provocou 99% de mortalidade em abelhas; após 24 horas, já o inseticida organofosforado metidationa também foi tóxico

após o fornecimento da pasta Cândi contaminada, causando mortalidade de 100%, 15 horas após o início do bioensaio.

A longevidade média das operárias de *A. mellifera* provenientes de tratamentos na alimentação foi de 4,77 horas, demonstrando a toxicidade por meio de ingestão (CARVALHO et al., 2009) mais acentuada do que a observada no presente trabalho. No entanto, deltametrina, um piretroide, em comparação aos outros dois produtos ocasionou baixa redução na longevidade média das operárias de *A. mellifera* (64,65 horas) (CARVALHO et al., 2009). A longevidade destas operárias é superior a observada no presente trabalho, um dos fatos a ser considerado é que os produtos utilizados no presente trabalho são sempre compostos por dois princípios ativos com modos de ação diferentes (piretroide + organofosforado ou piretroide neonicotinoide) o que pode levar a morte mais rápida dos insetos pelo modo de ação atuar em mais de uma área do sistema nervoso.

A ação dos inseticidas acontece geralmente por meio de paralisação de algum processo fisiológico ou bioquímico, mas o mecanismo real de ação é normalmente difícil de ser definido, o principal alvo dos inseticidas vem sendo o sistema nervoso, devido à eficiência rápida e eficaz no controle de insetos pragas. Neste sentido, os organofosforados, podem atuar por contato ou ingestão, inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase, fazendo com que ocorra um acúmulo de acetilcolina na sinapse, o que acaba gerando uma hiperexcitação do sistema nervoso levando a uma síndrome colinérgica. A hiperexcitação também acontece com os insetos que entram em contato com os neonicotinóides, que ligam-se aos receptores de acetilcolina dos neurônios pós-sinápticos. Já os piretroides atuam nos canais de sódio do sistema nervoso central e periférico dos insetos, fazendo com que eles fiquem constantemente abertos, e o influxo de sódio causa uma despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio, acarretando também na hiperexcitabilidade dos insetos (GALLO et al., 2002). Por isso que nestes testes os insetos apresentaram uma longevidade baixa em relação à testemunha, pois os PFSs testados eram compostos por mais de um princípio ativo, levando o inseto a intoxicação e morte mais rápida.

Larvas de abelhas *A. mellifera* tratadas com imidacloprido apresentaram 61% de mortalidade e elevada morte celular por apoptose (comprovada pela localização de Anexina V através de análises do DNA) no intestino médio, glândulas salivares e ovários (GREGORC; ELLIS, 2011).

Na análise histológica foi possível observar diferenças na estruturação do intestino médio das operárias de *A. mellifera* alimentadas com os três PFSs (Figuras 4B, C e D) quando comparada à estruturação do intestino médio das abelhas alimentadas com pasta Cândi pura (testemunha – Figura 4A). Verificou-se que os PFSs, nas concentrações testadas, provocaram desestruturação e desorganização celular no intestino de *A. mellifera*, induzindo a apoptose.

As abelhas operárias forrageadoras quando estão no campo e entram em contato com produtos fitossanitários sintéticos acabam transpostando-os para dentro das colônias, podendo levar ao desaparecimento da mesma em situações mais extremas (GILL; RAMOS-RODRIGUEZ; RAINE, 2012).

Tiametoxam é um inseticida neonicotinoide utilizado no controle de insetos-pragas da agricultura, porém, quando analisadas as células digestivas e regenerativas do mesentêro de abelhas africanizadas *A.*

mellifera expostas a doses subletais de tiametoxam iguais a 1/10 e 1/100 da LC50 (4,28 ng do ingrediente ativo/ μ L da dieta) pôde-se perceber alterações morfológicas e histoquímicas, como vacuolização do citoplasma, aumento da secreção apócrina e aumento da eliminação celular, ou seja, doses subletais de tiametoxam podem danificar o mesêntero das abelhas operárias contribuindo para a redução da vida das mesmas (OLIVEIRA et al., 2012).

A exposição química da colônia de abelhas pode afetar na viabilidade espermática das abelhas rainhas, na qual a utilização de doses sub-letais de imidacloprido acabou diminuindo a viabilidade espermática em 50%, sete dias após o tratamento, e a consequência disso é que pode ocorrer uma baixa expressão de genes que estão envolvidos com desenvolvimento, respostas imunes e desintoxicação (CHAIMANEE et al., 2016).

Em um estudo piloto realizado na Bélgica com a análise da presença de produtos fitossanitários sintéticos na cera de favos das colmeias, comprovou a presença de resíduos de quase 300 compostos organoclorados e organofosforados e foi possível a identificação de 18 produtos fitossanitários sintéticos utilizados na agricultura local, inclusive com a presença de produtos que são proibidos na Europa (RAVOET et al., 2015). Acredita-se que as abelhas vão em busca do pólen e do néctar, e quando os trazem para as colônias, junto vem os produtos que acabam contaminando não só as abelhas como a colônia toda (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014).

Conclusão

Os três produtos fitossanitários sintéticos, Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; Imidacloprido + Beta-Ciflutrina; Fenitrotiona + Esfenvalerato, reduziram a longevidade das operárias de *A. mellifera* africanizada em todos os bioensaios, além de causar desestruturação nas células do mesêntero. Estes produtos, nas concentrações testadas, não se apresentaram seletivos para operárias de *A. mellifera* africanizada.

Referências

AGROFIT. *Sistema de agrotóxicos fitossanitários*. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 jan. 2017.

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A. *BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Belém: Ong Mamiraua, 2007.

BAIO, F.; KOICHI, G. Pesticide residues and bees a risk assessment. *Plos One*, v. 9, n. 4, p.1-16, 2014.

BAPTISTA, A. P. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, S. M., CARVALHO, C. F., FILHO, J. S. S. B. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. *Ciência Rural*, Santa Maria v.39, n.4, p.955-961, 2009.

BRASIL. F. M. P.. Embrapa. *Produção de mel*. Introdução e histórico. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, A. F.; BUENO FILHO J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: apidae). *Revista Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 4, p.597-606, out. 2009.

CHAIMANEE, V.; EVANS, J. D.; CHEN, Y.; JACKSON, C.; PETTIS, J.S. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal Of Insect Physiology*, v. 89, p.1-8, 2016.

DEVINE, G. R. J.; FURLONG, M, J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agricultural and Human Values*, v.24, p.281- 306, 2007.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. *Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros*. Brasília: MMA, 2012. 112 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. L. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, v. 491, n. 7422, p.105-108, 2012.

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, v. 99, p.200-207, 2011.

MORAIS, M. R. de; ZANARDI, O. Z.; RUGNO, G.R.; YAMAMOTO, P.T. Impact of five insecticides used to control citrus pests on the parasitoid *Ageniaspis citricola* Longvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae). *Ecotoxicology*, v. 25, n. 5, p.1011-1020, 2016.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-Effects of Thiamethoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Toxicology*, v. 29, p.1122-1133, 2012.

PORRINI, C.; MUTINELLI, F.; BORTOLOTTI, L.; GRANATO, A.; LAURENSEN, L.; ROBERTS, K.; GALLINA, A.; SILVESTER, N.; MEDRZYCKI, P.; RENZI, T.; SGOLASTRA, F.; LODESANI, M. The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. *Plos One*, v. 11, n. 5, p.1-22, 2016.

RAVOET, J.; REYBROECK, W.; GRAAF, D. C. de. Pesticides for Apicultural and/or Agricultural Application Found in Belgian Honey Bee Wax Combs. *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 94, n. 5, p.543-548, 2015.

RUNDLÖF, M.; ANDERSSON, G.K; BOMMARCO, R.; FRIES, I.; HEDERSTRÖM, V.; HERBERTSSON, L.; JONSSON, O.; KLATT, B. K.; PEDERSEN, T.R.; YOURSTONE, J.; SMITH, H. G. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, v. 521, n. 7550, p.77-80, 2015.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *Plos One*, v. 9, n. 4, p.18-16, 2014.

SANFORD, M. T. Pollination of Citrus by Honey Bees. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AA/AA09200.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

SILVA, F. DE A. E S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 4 n. 1, p.71-78, 2002.

THANY, S. H.; BOURDIN, C. M.; GRATON, J.; LAURENT, A. D., MATHÉ-ALLAINMAT, M.; LEBRETON, J.; QUESTEL, J. Y. Similar Comparative Low and High Doses of Deltamethrin and Acetamiprid Differently Impair the Retrieval of the Proboscis Extension Reflex in the Forager Honey Bee (*Apis mellifera*). *Insects*, v. 6, p.805-814, 2015.

TABELAS:

Tabela 1. Produtos Fitossanitários Sintéticos (PFS) utilizados nos bioensaio, princípio ativo, grupo químico, cultura indicada, insetos alvos, dosagem e calda..

Produto/ tratamento	Princípio ativo	Grupo químico	Cultura indicada	Insetos	Dosagem	Calda preparada
PFS 1	Acetamiprido + Alfa-	Neonicotinóide + Piretroide	Arroz irrigado e	Percevejo, fede-fede,	300 mL/ha 200L de	0,15 mL do produto

	cipermetrina		soja	percevejo-marrom, percevejo-verde, percevejo-pequeno	calda/ha	+ 100 mL de água esterilizada deionizada
PFS 2	Imidacloprido + Beta-Ciflutrina	Neonicotinóide + Piretroide	Algodão, batata, feijão, melão, milho, soja, tomate e trigo	Mosca-branca, bicudo, larva-alfinete, pulgão-verde, lagarta-cartucho, percevejos, lagarta da soja,	750 mL/ha 200L de calda/ha	0,38 mL do produto + 100 mL de água esterilizada deionizada
PFS 3	Fenitrotiona + Esfenvalerato	Piretroide + organofosforado	Algodão, cebola, crisântemo e soja	Bicudo, tripes e percevejos	300 mL/ha 200L de calda/ha	0,15 mL do produto + 100 mL de água esterilizada deionizada

Fonte: AGROFIT (2017)

Tabela 2. Longevidade média (em horas) \pm EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após serem submetidas a três bioensaio com produtos fitossanitários sintéticos. (Temperatura $34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$).

Parâmetro	Tratamento	Longevidade (horas) \pm EP
Bioensaio 1. Pulverização de produtos fitossanitários sintéticos sobre <i>A. mellifera</i>	Testemunha	104,7 \pm 2,99 a
	PFS 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	1,0 b
	PFS 2: Imidacloprido + Beta-Ciflutina	1,0 b
	PFS 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato	2,2 \pm 0,25 b
<i>p</i> valor		<0,01
Bioensaio 2. Contato de <i>A. mellifera</i> com superfície pulverizada com produto fitossanitário sintético	Testemunha	118,4 \pm 0,78 a
	PFS 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	0,0 b
	PFS 2: Imidacloprido + Beta-Ciflutina	0,0 b
	PFS 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato	0,0 b
<i>p</i> valor		<0,01
Bioensaio 3. Pasta cãndi incorporada com produtos fitossanitários sintéticos	Testemunha	90,5 \pm 4,98 a
	PFS 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	22,0 \pm 1,90 b
	PFS 2: Imidacloprido + Beta-Ciflutina	21,7 \pm 1,96 b
	PFS 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato	43,9 \pm 3,84 c
<i>p</i> valor		<0,01

Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Duncan, em nível de 95% de credibilidade. EP: Erro Padrão. PFS: produto fitossanitário sintético.

FIGURAS:

Figura 1. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após pulverização direta de três produtos fitossanitários sintéticos (A: Testemunha; B: PFS 1 – Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; C: PFS 2 - Imidacloporido + Beta-Ciflutina- e D: PFS 3 -Fenitrotiona + Esfenvalerato), sobre operárias adultas de *Apis mellifera*. PFS: Produto fitossanitário sintético.

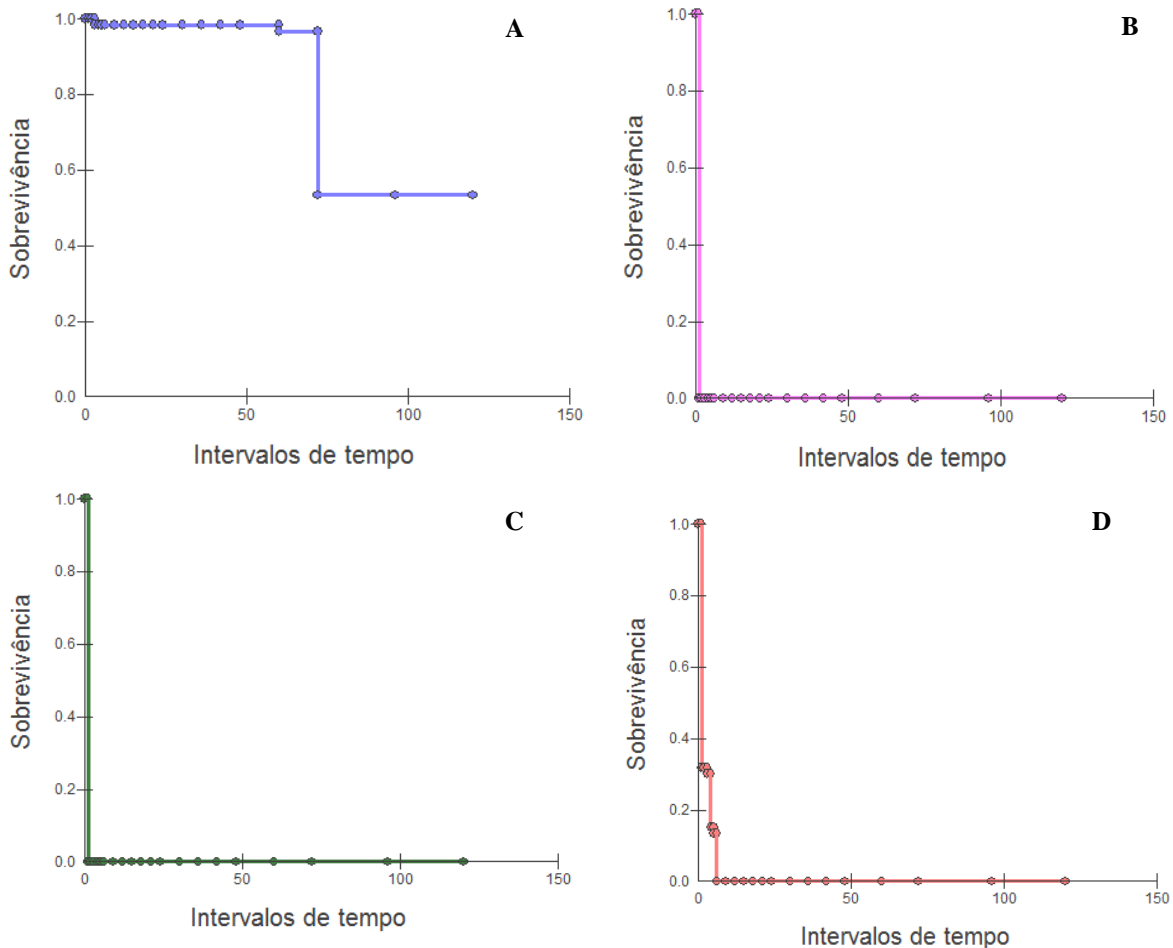


Figura 2. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato em placa de Petri de operárias adultas de *Apis mellifera* com água deionizada esterilizada (testemunha). Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2016.

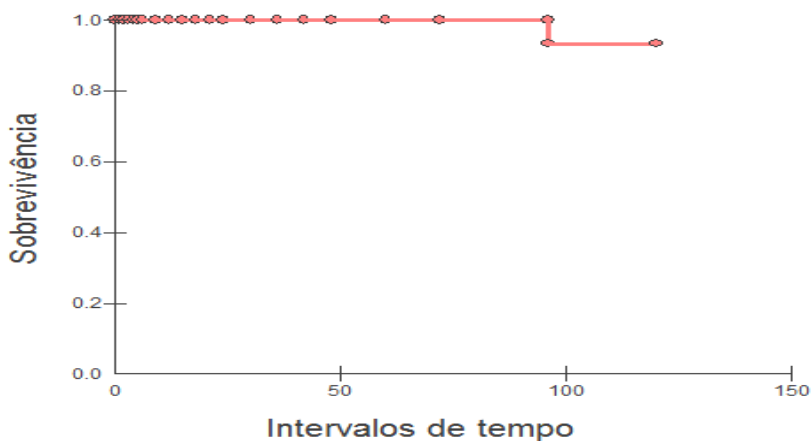


Figura 3. Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após alimentação de operárias adultas de *Apis mellifera* com as diferentes produtos fitossanitários sintéticos (A: Testemunha; B: PFS 1 – Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; C: PFS 2 - Imidacloporido + Beta-Ciflutrina- e D: PFS 3 - Fenitrotiona + Esfenvalerato). Temperatura ($34 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$). UTFPR, *Câmpus Dois Vizinhos*, PR, 2016. PFS: Produto fitossanitário sintético.

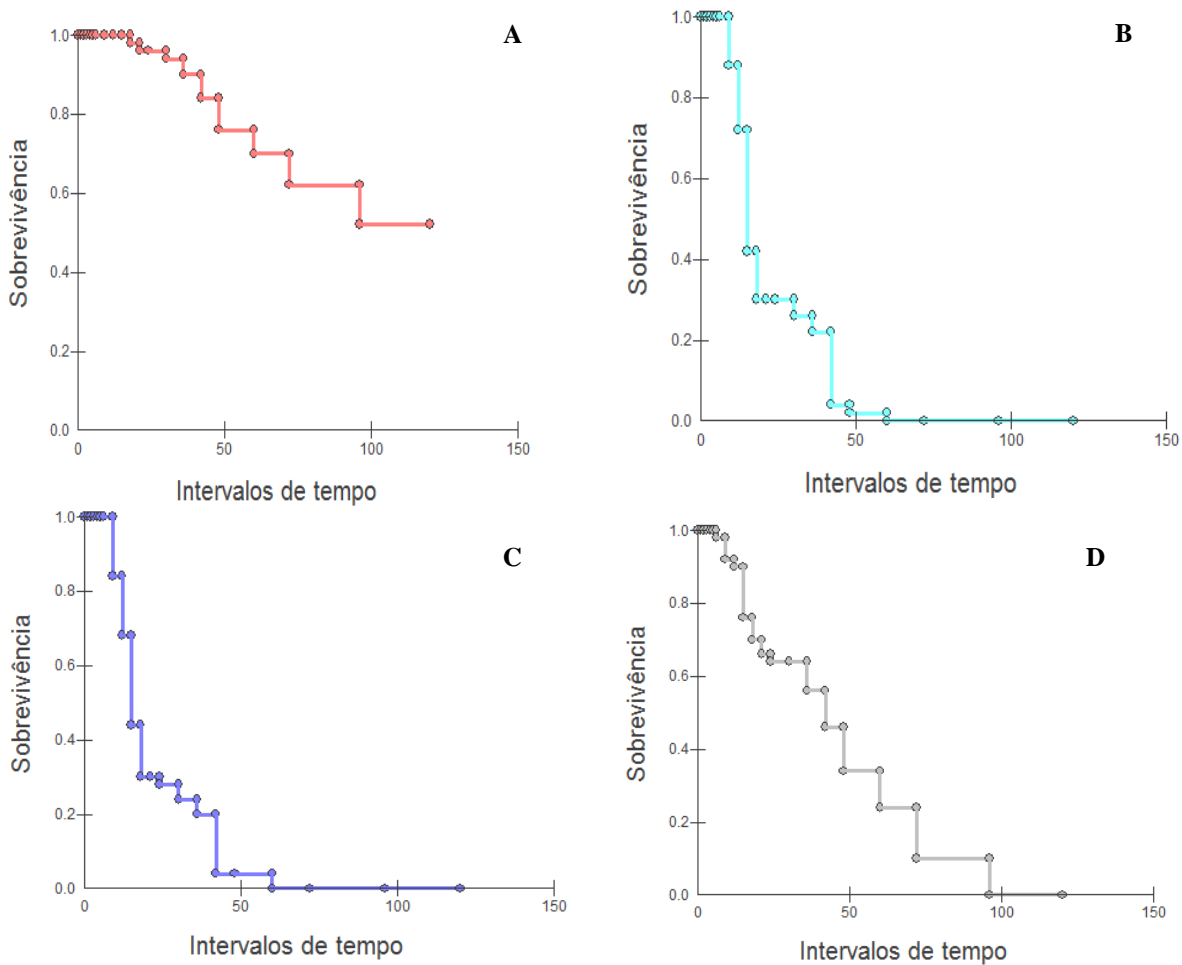
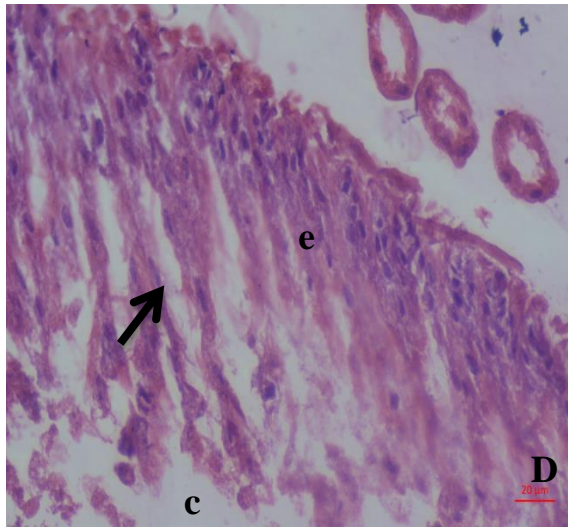
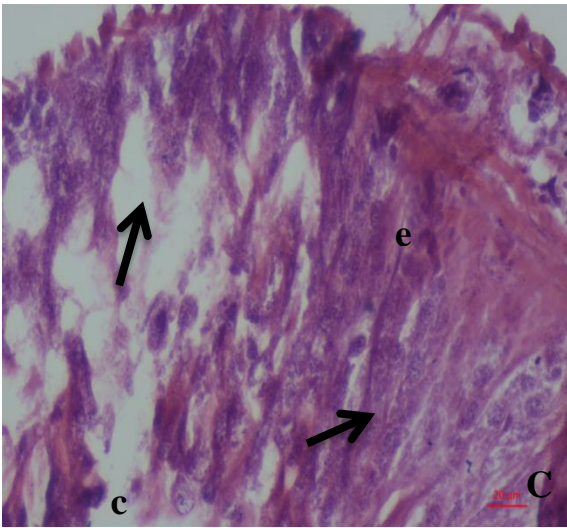
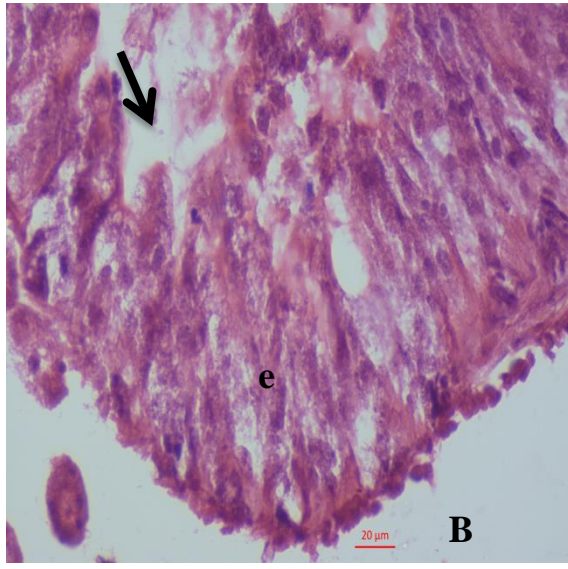
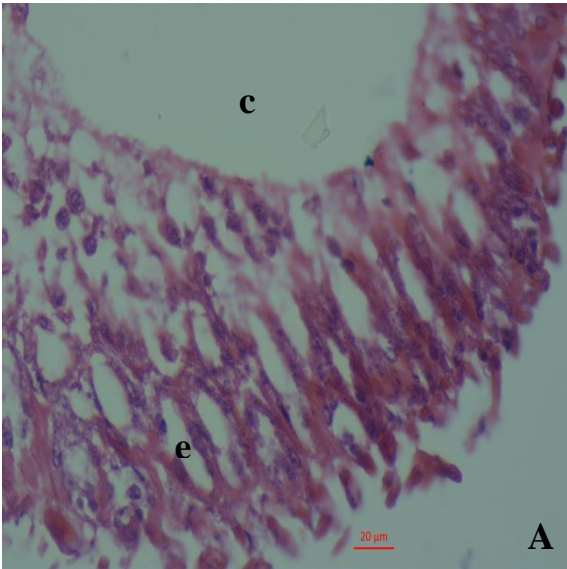


Figura 4. Fotomicrografia do mesêntero de *Apis mellifera* (Microscópio Biológico Binocular de luz, Zeiss Primo Star, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 40X). Abelhas operárias alimentadas com: A) Pasta cândi pura; B) Pasta cândi + Produto 1: Acetamiprido + Alfa-cipermetrina; C) Pasta cândi + Produto 2: Imidacloporido + Beta-Ciflutrina; D) Pasta cândi + Produto 3: Fenitrotiona + Esfenvalerato. O epitélio de revestimento de mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada os PFSs apresentou desestruturação (setas), devido a ação dos produtos. e = Epitélio de revestimento; c = Cavidade do mesêntero.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos bioensaios de pulverização direta e de contato em placa de petri, realizados com a bactéria *Bacillus thuringiensis* sobre as operárias de *Apis mellifera* africanizada, não apresentaram grande influência na longevidade delas. Verificando que estes meios de contato de *A. mellifera* com *B. thuringiensis* são pouco prejudiciais para estas abelhas, além disso, em campo, onde o contato é ainda menor e tem-se outros fatores associados, estes efeitos podem ser ainda mais amenizados.

Porém, as três linhagens utilizadas diminuíram a sobrevivência das abelhas no teste da alimentação, e quando analisada a histologia do mesentêro das operárias, foi possível avaliar que a morte foi causada pelas bactérias que degradaram os tecidos do intestino.

Já os produtos fitossanitários sintéticos reduziram a longevidade das operárias de *A. mellifera* africanizada nos três bioensaios avaliados.

Apesar das linhagens de Bt reduzirem a longevidade das operárias de *A. mellifera* não é possível afirmar que não sejam seletivas, pois a interferência é mínima quando comparada à interferência verificada pelos PFSs, os quais provocaram drástica redução na longevidade de *A. mellifera*, interferindo diretamente na sobrevivência dessas abelhas.

Sugere-se a realização de novos experimentos que avaliem os efeitos dessas linhagens de *B. thuringiensis* e desses produtos fitossanitários sintéticos sobre as diferentes castas de *A. mellifera*. Além disso, trabalhos avaliando outros micro-organismos entomopatogênicos e outros produtos fitossanitários sintéticos tornam-se cada vez mais necessários para atestar a segurança dos mesmos sobre *A. mellifera* africanizada.

APÊNDICE A

NORMAS DA REVISTA ACTA SCIENTIARUM

Diretrizes para Autores

POLÍTICA DE ACESSO ABERTO

Acta Scientiarum. Agronomy é publicada sob o modelo Acesso Aberto e permite a qualquer um a leitura e download, bem como a cópia e disseminação de seu conteúdo de acordo com as políticas de copyright Creative Commons Attribution 3.0

APCs (TAXA DE PROCESSAMENTO DE ARTIGO) E TAXA DE SUBMISSÃO

Acta Scientiarum. Agronomy não cobra aos autores qualquer tipo de taxa de submissão ou publicação.

POLÍTICA CONTRA PLÁGIO E MÁSCONDUITAS EM PESQUISA

Continuando nossa tradição de excelência, informamos as melhorias editoriais que visam fortalecer a integridade dos artigos publicados por esta revista. Em conformidade com as diretrizes do COPE (*Committee on Publication Ethics*), que visam incentivar a identificação de plágio, más práticas, fraudes, possíveis violações de ética e abertura de processos, indicamos:

1. Os autores devem visitar o website do COPE <http://publicationethics.org>, que contém informações para autores e editores sobre a ética em pesquisa;

2. Antes da submissão, os autores devem seguir os seguintes critérios:

- artigos que contenham aquisição de dados ou análise e interpretação de dados de outras publicações devem referenciá-las de maneira explícita;
- na redação de artigos que contenham uma revisão crítica do conteúdo intelectual de outros autores, estes deverão ser devidamente citados;
- todos os autores devem atender os critérios de autoria inédita do artigo e nenhum dos pesquisadores envolvidos na pesquisa poderá ser omitido da lista de autores;
- a aprovação final do artigo será feita pelos editores e conselho editorial.

3. Para responder aos critérios, serão realizados os seguintes procedimentos:

- a) Os editores avaliarão os manuscritos com o sistema CrossCheck logo após a submissão. Primeiramente será avaliado o conteúdo textual dos artigos científicos, procurando identificar plágio, submissões duplicadas, manuscritos já publicados e possíveis fraudes em pesquisa;
- b) Com os resultados, cabe aos editores e conselho editorial decidir se o manuscrito será enviado para revisão por pares que também realizarão avaliações;
- c) Após o aceite e antes da publicação, os artigos poderão ser avaliados novamente.

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:

1. Acta Scientiarum. Agronomy, ISSN 1807-8621 (*on-line*), é publicada trimestralmente pela Universidade Estadual de Maringá.

2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Agronomia, incluindo ciência do solo, entomologia agrícola, fertilidade do solo e adubação, física do solo, fisiologia de plantas cultivadas, fitopatologia, fitossanidade, fitotecnia, gênese, morfologia e classificação dos solos, manejo e conservação do solo, manejo integrado de pragas das plantas, melhoramento vegetal, microbiologia agrícola, parasitologia agrícola e produção e beneficiamento de sementes.
3. Os autores se obrigam a declarar que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-se disponível no endereço: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/about/submissions>.
4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do Conselho Editorial da revista.
5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.
6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês.
7. Os artigos serão avaliados por, no mínimo, três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.
8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o **Portal ACTA**, no endereço <http://www.uem.br/acta>.
9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.
10. O texto em inglês dos artigos aceitos para publicação será submetido à correção do *American Journal Experts* e custeado pelos autores. (<http://www.journalexerts.com>).
11. Não serão aceitos manuscritos nos quais:
 - a) os experimentos de campo não incluam dados de dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
 - b) a análise de dados obtidos de ambientes controlados seja limitada a apenas um experimento ou bioensaio, sem repetições durante o período;
 - c) os experimentos se refiram a apenas testes sobre a atividade de produtos químicos ou biológicos contra agentes bióticos ou estresses fisiológicos;

d) os experimentos com cultura *in vitro* sejam limitados ao melhoramento dos protocolos padronizados de cultura ou os que não forneçam novas informações no campo;

e) seus objetivos sejam limitados a registrar a primeira ocorrência de um organismo nocivo ao sistema ecoagrícola ou um estudo básico sobre os parâmetros biológicos do organismo sem uma definida indicação de como esse conhecimento poderia melhorar o manejo da praga no contexto local ou regional.

12. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão, deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo seis), seus endereços institucionais e o *e-mail* do autor indicado para correspondência.

b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, *Keywords*, Introdução, Material e métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.

c) O título, com no máximo vinte palavras, em português e inglês, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras.

d) O resumo, não excedendo 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis palavras-chave que não estejam citadas no título deverão ser acrescentadas ao final tanto do resumo como do *abstract*.

e) Os artigos não deverão exceder 18 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no *Word*, ou compatível, utilizando *Times New Roman* fonte 12.

f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.

g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do *Word*.

h) Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados.

i) As figuras e as tabelas deverão ter preferencialmente 7,65 cm de largura e não deverão ultrapassar 16 cm.

j) As figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravadas no formato jpg ou png. Ilustrações em cores serão aceitas para publicação.

k) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

l) As equações deverão ser editadas, utilizando o *software Math Type* ou inseridas como figura jpg ou png.

m) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

n) Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão para fatores quantitativos.

o) Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.

p) A revista recomenda que oitenta por cento (80%) das referências bibliográficas sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge*, *Scopus* ou *SciELO* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência às citações de artigos internacionais. Não serão aceitas nas referências citações de monografias, dissertações e teses, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.

q) As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Para citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); para dois autores: Souza e Scapim (2005) ou (Souza & Scapim, 2005); para três a cinco autores (1.^a citação): Venturieri, Venturieri e Leopoldo (2013) ou (Venturieri, Venturieri & Leopoldo, 2013) e, nas citações subsequentes, Venturieri et al. (2013) ou (Venturieri et al., 2013); para seis ou mais autores, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Wayner et al. (2007) ou (Wayner et al., 2007).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Listar todos os autores do trabalho. Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados e em itálico, sem o local de publicação.

Artigos

Um autor

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.

Dois a sete autores (devem-se indicar todos os autores separados por vírgula, exceto o último que deve ser separado por vírgula seguido de &)

Caporusso, N. B., & Rolim, G. S. (2015). Reference evapotranspiration models using different time scales in the Jaboticabal region of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(1), 1-9. doi: 10.4025/actasciagron.v37i1.18277

Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., & Muys, B. (2008) *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1063-1084.

Oito ou mais autores (devem-se indicar os seis primeiros, inserir reticências e acrescentar o último autor)

Soares, M. A., Leite, G. L. D., Zanuncio, J. C., Sá, V. G. M., Ferreira, C. S., Rocha, S. L., ... Serrão, J. E. (2012). Quality Control of *Trichogramma atopovirilia* and *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae) adults reared under laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(2), 305-311.

Livros

Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Edinburgh, SC: Addison Wesley Longman.

Kevan, P. G., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2006). *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature*. 2nd ed. Brasília, DF: Secretariat for Biodiversity and Forests.

Parra, J. R. P. (1991). Consumo e utilização de alimentos por insetos. In A. R. P. Panizzi (Ed.), *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas* (p. 9-65). São Paulo, SP: Manole.

Prazo médio entre submissão e publicação dos artigos publicados em 2015: 30,2 meses.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita e não está sendo avaliada por outra revista.

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapasse 2MB).

Todos os endereços de páginas da Internet, incluídas no texto (Ex: <http://www.eduem.uem.br>) estão ativos e prontos para clicar.

O texto está em espaçamento 1,5; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. No máximo **18** páginas.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção propriedades do Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação por Pares Cega.

APÊNDICE B**NORMAS DA REVISTA SÊMINA-CIÊNCIAS AGRÁRIAS****AUTHOR GUIDELINES****GUIDELINES FOR AUTHORS****ATTENTION AUTHORS:**

WE RECOMMEND THAT AUTHORS THOROUGHLY CONSULT THE GUIDELINES, SINCE PAPERS THAT ARE NOT PREPARED RIGOROUSLY ACCORDING TO THE STANDARDS WILL NOT BE ACCEPTED.

After 02/19/2015, the submission fee for new articles will be R\$ 100,00. If the article is rejected, this fee will not be returned.

Articles submitted after **02/19/2015** that are accepted and approved for publication will be subjected to a Publication Fee, adjusted according to the number of pages in the manuscript.

Up to 10 pages: **R\$ 300.00**

From 11 to 15 pages: **R\$ 400.00**

From 16 to 20 pages: **R\$ 500.00**

From 21 to 25 pages: **R\$ 600.00**

If the **article is accepted for publication**, the amount of **R\$ 100.00** paid for the submission fee **will not be deducted from the publication fee**.

The **proof of deposit** should be scanned and annexed as a supplementary file in the electronic system.

Editorial standards for publishing in Semina: Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Articles can be submitted in Portuguese or English, but will only be published in English. Articles that are submitted in Portuguese, if accepted for publication, will have to be **translated into English**.

Articles sent to the journal by march 31, 2014 and those that are still being processed may be published in Portuguese; however, priority for publication will be given to the articles that are translated into English.

All articles, after being accepted for publication, must be accompanied by a proof certificate of translation or correction (as a supplementary file) from one of the following translation services:

[American Journal Experts](#)

[Editage](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

The lead author must attach the **document that provides evidence of** this translation or correction in the electronic system on the submission page in **“Docs. Sup.”**

COMMENTS:

1) Original manuscripts submitted for review are initially assessed by the Editorial Committee of *Semina: Ciências Agrárias*. In this assessment, quality requirements for publishing with the journal will be evaluated, such as scope of the article, suitability with regard to the journal standards, quality of writing and theoretical foundation. Additionally, it is also considered literature review update, consistency and accuracy of the methodology, contribution of the results, discussion of the data observed in the study, table and figure depiction, and originality and consistency of conclusions.

If the number of submitted manuscripts exceeds the assessment and publication capacity of *Semina: Ciências Agrárias*, a comparison between submissions will be made, and the works considered to have the highest contribution potential to scientific knowledge will be directed to ad hoc advisors. The manuscripts that are not approved by these criteria are archived, whereas the remaining manuscripts are subjected to assessment by at least two scientific advisors who are experts in the subject area of the manuscript, without identifying the authors. The submission fee will not be returned to authors who have their manuscripts archived.

2) Where appropriate, if the research project that originated the article was performed according to biosafety and ethics technical standards under approval from an ethics committee involving humans and/or an ethics committee involving animals, the commission name, institution, and process number should be stated.

MANDATORY REQUIREMENTS FOR ACCEPTANCE:

a) The attached main article file has the names of the authors and their respective affiliations.

b) The **complete registration** of all authors has been added to the metadata during submission; **Example:** Full name; Institution/Affiliation; Country;

Summary of Biography/Title/Role.

c) Text explaining the relevance of the work (importance and distinction from previously published works), with a maximum length of 10 lines, is included in the field COMMENTS TO THE EDITOR.

d) The submission is accompanied by a document proving payment of the submission fee as a supplementary file in the "**Docs. Sup.**" section.

e) The main article is accompanied by supplementary files, including graphs, figures, photos, and other documents, IN THEIR ORIGINAL VERSION (JPEG, TIFF, or EXCEL formats).

f) The following information is included in the original manuscript: title, abstract, keywords in Portuguese and English, tables, and figures.

RESTRICTIONS BY SUBJECT AREA:

FOR THE AGRONOMY FIELD, MANUSCRIPTS WILL NOT BE ACCEPTED IN CASE OF THE FOLLOWING:

a) The experiments conducted with an *in vitro* culture are limited to the improvement of protocols already standardized or do not provide new information about the subject area;

b) The field experiments do not include data corresponding to at least two years or to diverse locations within the same year;

c) The experiments refer only to tests about the efficiency of commercial products against biotic and abiotic agents or physiological stress;

d) The experiments involve only bioassays (screening) on the efficacy of methods for controlling insects, mites, or diseases in plants, unless they contain an important contribution about the action mechanisms under the perspective of a frontier of knowledge; or

e) The objective is limited to registering the occurrence of a species of a plague or pathogen or associations with hosts in new locations within geographical regions where the species is already known. Documenting already known species or associations will only be considered if they are described in new ecological areas. The distribution records should be based on ecosystems and not on political boundaries.

FOR THE VETERINARY FIELD, THE MANUSCRIPTS WILL NOT BE ACCEPTED IN CASE OF THE FOLLOWING:

a) Publication of case reports is restricted; only articles with great relevance and originality that make a real contribution to the advance of knowledge in the field will be selected for processing.

Work Categories

- a) Scientific articles: maximum of 20 pages, including figures, tables, and bibliographic references
- b) Scientific communications: maximum of 12 pages, with bibliographic references limited to 16 citations and a maximum of two tables, two figures, or a combination of one table and one figure
- c) Case reports: maximum of 10 pages, with bibliographic references limited to 12 citations and a maximum of two tables, two figures, or one table and one figure
- d) Review articles: maximum of 25 pages, including figures, tables, and bibliographic references

Presentation of the Work

Complete original articles, communications, case reports, and reviews should be written in Portuguese or English using Microsoft Word for Windows, on A4-size paper, with lines numbered per page, 1.5 spacing between lines, Times New Roman font, size 11 normal, 2 cm margins on all sides, with pages numbered on the upper right corner and following the guidelines for the maximum number of pages according to the category of the work.

Figures (drawings, graphics, and photographs) and tables should be numbered with Arabic numerals, should be included at the end of the work immediately after the bibliographic references, and should be cited within the text. In addition, the figures must be of good quality and must be attached in their original format (JPEG, TIFF, etc.) in Docs Sup on the submission page. Figures and tables will not be accepted if they do not comply with the following specifications: width of 8 cm or 16 cm with maximum height of 22 cm. If the figure has greater dimensions, it will be reduced during the editorial process to the above-mentioned dimensions.

Note: Figures (Ex. **Figure 1.** Title) and tables (**Table 1.** Title) should have a width of 8 cm or 16 cm with maximum height of 22 cm. Those with greater dimensions will be reduced during the editorial process to the above-mentioned dimensions. For any tables and figures that are not the author's original work, a citation to the source consulted is mandatory. Place this citation below the table or figure and indicate using a smaller font (Times New Roman 10).

Ex: "**Fonte**": IBGE (2014), or **Source**: IBGE (2014).

Manuscript preparation

Scientific article:

Scientific articles should report results of original research on the related areas, with the sections organized in the following way: Title in English; Title in Portuguese; Abstract in English with keywords (maximum six words, in alphabetic order); Abstract in Portuguese with keywords (maximum six words, in alphabetical order); Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion, with Conclusions at the end of the Discussion or Results

(Discussion and Conclusions should be written separately); Acknowledgements; Suppliers, if applicable; and Bibliographic References. The headings should be in boldface without numbering. If there is a need to include a sub-heading within a section, it should be placed in italics, and if there are further sub-topics to include under a sub-heading, these should be numbered with Arabic numerals. (Example: **Materials and Methods**, *Areas of study*, 1. *Rural area*, 2. *Urban area*.)

The submitted work cannot have been published elsewhere with the same content, except in the form of an Abstract in Scientific Events, Introductory Notes, or Reduced Format.

The work should be presented in the following order:

1. Title of the work, accompanied by its translation in Portuguese, if appropriate.

2. Abstract and Keywords: An informative abstract with a minimum of 200 words and a maximum of 400 words must be included, in the same language used in the text of the article, accompanied by an English translation (*Abstract and Keywords*) if the text has not been written in English.

3. Introduction: The introduction must be concise and contain only the review that is strictly necessary to introduce the topic and support the methodology and discussion.

4. Materials and Methods: This section may be presented in a continuous, descriptive way or with sub-headings to allow the reader to understand and be able to repeat the methodology cited with or without the support of bibliographic citations.

5. Results and Discussion: *This section* must be presented in a clear way, with the aid of tables, graphs, and figures, so that it does not raise any questions for the reader with regard to the authenticity of the results and points of view discussed.

6. Conclusions: *These* must be clear and presented according to the objectives proposed in the work.

7. Acknowledgements: People, institutions, and companies that contributed to the work should be mentioned at the end of the text, before the Bibliographic References section.

Note:

Notes: Each note regarding the body of the text must be indicated with a superscripted symbol immediately after the phrase it concerns and must be included as a footnote at the end of the page.

Figures: The figures that are deemed essential will be accepted and should be cited in the text by their numeric order, in Arabic numerals. If any submitted

illustrations have already been published, the source and permission for publication should be stated.

Tables: Tables should be accompanied by a header that will allow understanding of the data collected without the need to use the body of the text for reference.

Quantities, units, and symbols:

- a) Manuscripts should be in agreement with the criteria established in the International Codes for each subject area.
- b) Use the International System of Units in all text.
- c) Use the negative power format to note and present related units: e.g., kg ha^{-1} . Do not use the forward slash symbol to relate units: e.g., kg/ha.
- d) Use a simple space between units: g L^{-1} , not g.L^{-1} or gL^{-1} .
- e) Use 24-hour time representation with four digits for the hours and minutes: 09h00, 18h30.

8. In-text author citations

Citations must be followed by the year of publication, and multiple citations should follow the alphabetical order system, according to the following examples:

- a) The results by Dubey (2001) confirmed that
- b) According to Santos et al. (1999), the effect of nitrogen
- c) Beloti et al. (1999b) assessed the microbiological quality
- d) [...] and inhibit the test for syncytium formation (BRUCK et al., 1992).
- e) [...] compromising the quality of its derivatives (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citations with two authors

In citations of sources that have two authors, the authors' names are separated by a semicolon when citing them within parentheses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Use *and* when the authors are included in the sentence rather than cited in parentheses.

Ex: Pinheiro and Cavalcanti (2000).

Citing more than two authors

Indicate the first author followed by the expression et al.

Within parentheses, separate references with a semicolon when more than one reference is cited.

Ex: (RUSSO et al., 2000) or Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Citing multiple documents by the same author, published in the same year

Add lowercase letters, in alphabetical order, after the date and without a space.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

Citing multiple documents by the same author, published in different years

Separate the dates with a comma.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Citing various documents by various authors, mentioned simultaneously

Place the citations in alphabetical order, separated by a semicolon.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. References: The references, according to the standard NBR 6023, Aug. 2000, and reformulation number 14.724 of the Brazilian Technical Standards Association (ABNT), 2011, must be listed in alphabetical order at the end of the manuscript. **All the authors participating in a referenced study must be mentioned, regardless of the number of participants.** The accuracy and adequacy of references for works that have been consulted and mentioned in the text of the article, as well as opinions, concepts, and statements, are entirely the responsibility of the authors.

Note: Consult recently published issues of *Semina: Ciências Agrárias* for more details about how to format references in the article.

The remaining categories of works (Scientific Communication, Case Report, and Review) must follow the above-mentioned standards but with the following additional directions for each category:

Scientific communication

Scientific communications must be presented in a concise manner but with a complete description of the term research or ongoing research (Introductory note), with complete bibliographic documentation and methodologies, similar to a regular scientific article. Scientific communications must contain the following sections: Title (in Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; and Body of the text. The body of the text should not be divided into sections but should follow this sequence: introduction, methodology, results and discussion (tables and figures may be included), conclusion, and bibliographic references.

Case report

A case report should be a brief description of clinical and pathological cases, unprecedented results, reporting of new species, or studies on the occurrence or incidence of plagues, microorganisms, or parasites of agronomic, zootechnical, or veterinary interest. The case report must contain the following sections: Title (Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; Introduction with a literature review; case report(s), including results, discussion, and conclusion; and bibliographic references.

Bibliographic review articles

Review articles must involve relevant topics within the scope of the journal. The number of review articles per issue is limited, and authors can only write review articles of interest to the journal, following an invitation by the editorial board members of the journal. If a review article is submitted by an author, the inclusion of relevant results from the author or from the group involved in the study is required, along with bibliographic references demonstrating experience and knowledge about the topic.

A review article must contain the following sections: Title (Portuguese and English); Abstract with Keywords in Portuguese; Abstract with Keywords in English; Development of the proposed topic (the text may be divided into sections, but this is not required); Conclusions or Final Considerations; Acknowledgements (if applicable); and Bibliographic References.

Other important information

1. The publication of articles depends on the favorable opinion of ad hoc advisors and the approval of the *Semina: Ciências Agrárias* UEL Editorial Board.
2. Reprints will not be given to the authors, since the issues will be available online at the journal's website (<http://www.uel.br/revistas/uel>).
3. Copyright transfer: The authors agree with the transfer of publication rights of the manuscript to the journal. Reproduction of the articles is only allowed when the source is cited. Commercial use of the information is forbidden.
4. Unforeseen questions about or problems in the present standards will be addressed by the Editorial Board of the subject area in which the article was submitted for publication.
5. *Number of authors*: There is no limit to the number of authors, but people included as co-authors should have effectively participated in the study. People with limited participation in the study or the article preparation should be cited in the Acknowledgements section, as should institutions that granted scholarships and other financial resources.

Submission conditions

As part of our submission process, the authors should verify that the submission conforms to all of the items listed below. Submissions that are not in compliance with the standards will be rejected and the authors informed about the decision.

1. The authors should state that the contribution is original and new and that it is not being assessed for publication elsewhere; any exception(s) should be justified in the “Comments to the Editor.”
2. The authors should also state that the material is correctly formatted and that the Supplementary Documents are attached, BEING AWARE that the **incorrect format will result in the SUSPENSION of the evaluation process WITHOUT EVALUATION OF MERIT.**
3. **Authoring data for all of the authors should be entered in the Metadata field during the submission process.**

Use the button “include author.”

1. **In the following step, please fill in the metadata in English.**

In order to include the data, after saving the submission data in Portuguese, click on “**edit metadata**” at the top of the page. Change the language to English and insert the title in English, the abstract, and keywords. Save and continue to the next step.

1. The **authorship identification** of the work should be removed from the archive and from Word using the “Properties” option in order to ensure the anonymity criteria of the journal, in case the article is subjected to peer review, according to the directions available at [Ensuring a blind peer review](#).
2. The files for submission should be in Word, OpenOffice, or RTF format (as long as they do not exceed 2 MB).

The text should be typed on A4 paper, with numbered lines, 1.5 line spacing, and Times New Roman size 11 font.

1. Confirm that all ethical standards were followed if the research was performed with living beings. Include proof documents of approval by an institutional ethics committee involving humans and/or an ethics committee involving animals, if these documents are requested.
2. **Include the payment of the [Submission Fee](#), and attach the proof of payment as a supplementary document in “[Docs. Sup.](#)”**

Copyright Declaration

The **Copyright Declaration** for articles published in this journal is the author’s right. Since the articles published in this journal are open access, the articles may be used freely, with their own attributions, for educational and non-commercial purposes.

The journal has the right to make changes on a normative, orthographic, and grammatical level in the original articles, with the aim of maintaining proper

standard use of the language and the credibility of the journal. Nevertheless, the writing style of the authors will be respected.

Alterations, corrections, or suggestions at a conceptual level, when necessary, will be directed to the authors.

The opinions expressed by the authors of the articles are their exclusive responsibility.

Privacy Policy

The names and affiliations reported in this journal are used exclusively for the services provided and are not made available for any other purpose or to third parties.

APÊNDICE C

Abelhas operárias de *Apis mellifera* africanizada, entraram em contato com produtos fitossanitários sintéticos, e ao final desse período, todas foram encontradas mortas e com o aparelho bucal evertido.

