

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

FERNANDA CAROLINE COLOMBO

**SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS A  
*Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2019

FERNANDA CAROLINE COLOMBO

**SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS A  
*Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Orientadora: Prof. Dra. Michele Potrich  
Co-orientadoras: Prof. Dra. Patrícia Franchi de Freitas  
Prof. Dra. Fabiana Martins Costa-Maia

DOIS VIZINHOS

2019

C718s Colombo, Fernanda Caroline.  
Seletividade de fungos entomopatogênicos e óleos essenciais a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). / Fernanda Caroline Colombo – Dois Vizinhos, 2019. 80 f.:il.

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

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Patrícia Franchi de Freitas.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fabiane Martins Costa Maia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2019.

Bibliografia p.71-80.

1. Pragas - Controle biológico. 2. Abelhas africanizadas. 3. Óleos essenciais. I. Potrich, Michele. II. Freitas, Patrícia Franchi de, coorient. III. Maia, Fabiane Martins Costa, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V. Título

CDD: 632.96



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



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **Título da Dissertação n° 31**

**Seletividade de Fungos entomopatogênicos e óleos essenciais a *Apis mellifera* L.  
(Hymenoptera: Apidae)**

**Fernanda Caroline Colombo**

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia vinte e um de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), 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:

---

**Dra. Michele Potrich UTFPR - DV**

---

**Dr. Adeney de Freitas Bueno  
EMBRAPA-Soja**

---

**Dr. Sóstenez Alexandre Vessaro Silva  
FAG**

---

**Coordenador(a) do PPGSIS  
Assinatura e carimbo**

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente e principalmente aos meus pais, por apoiarem todas as minhas escolhas e por toda confiança depositada em mim. Eu sei o quanto não foi fácil, mas vocês nunca mediram esforços para me darem o melhor sempre. Com certeza o fato de vocês sempre estarem do meu lado, fez com que tudo ficasse mais fácil. Obrigada por toda compreensão, confiança, amor, carinho e incentivo em todos os momentos. Amo vocês mais do que tudo!

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

Ao meu namorado Rodrigo por carinho, incentivo, compreensão e principalmente pela paciência e parceria. Obrigada por ser muito mais do que um namorado, mas também por ser mãe, pai, amigo e colega de trabalho. Sua ajuda profissional e psicológica foi essencial na realização desse trabalho e em toda a fase do mestrado. Obrigada por sempre acreditar em mim, muito mais do que eu mesma. Você foi essencial nessa etapa da minha vida! Te amo!

À toda minha família, pelos momentos de descontração e por todo o amor que sempre me deram, mesmo à distância.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michele Potrich, por sempre ter me incentivado, mas principalmente por ter acreditado e confiado em mim. Com certeza, se hoje eu estou finalizando o mestrado, você é a culpada por grande parte disso. Obrigada pela excelente orientação, por ser amiga, “mãe” e por ser essa pessoa incrível. Se quando eu crescer, eu for um pouquinho do que você é, eu estarei realizada. Obrigada por todas as conversas, conselhos e cafés, você foi essencial na minha formação.

Às minhas co-orientadoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Franchi de Freitas, pela disposição em sempre auxiliar e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Martins Costa-Maia pelos ensinamentos e pela disponibilização do apiário.

Às minhas amigas Raiza, Amanda, Gabriela Libardoni e Gabriela Osowski, que infelizmente apareceram em minha vida somente na etapa final do mestrado, mas fizeram com que essa fase fosse muito mais leve. Obrigada pelos momentos de descontração,

pela amizade, carinho, risadas e festas. Quero essa amizade pra sempre, independente da distância. Vocês vão fazer muita falta na minha vida!

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

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico pelo auxílio em todos os experimentos, em especial à Fernanda Raulino, pelos ensinamentos e ajuda no apiário.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos pela disponibilização dos laboratórios e de toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Simbiose e à Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

## RESUMO

COLOMBO, Fernanda C. **SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS A *A. mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**. 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

As abelhas *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) africanizadas são insetos sociais, considerados úteis, devido sua importância para os agroecossistemas. Porém, estão sofrendo com a desordem do colapso das colônias e, dentre os suspeitos, destacam-se os inseticidas químicos sintéticos. Assim, como alternativa, têm-se o controle biológico e alternativo de pragas, no entanto, os efeitos de entomopatógenos e óleos essenciais sobre as abelhas ainda são escassos. Assim, objetivou-se avaliar o efeito dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Pogostemon cablin* a operárias de *A. mellifera* africanizadas. Para isto, em laboratório, foram realizados quatro bioensaios com os fungos entomopatogênicos ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) e com os óleos essenciais (0,75%): 1) Contato de *A. mellifera* em superfície vítrea pulverizada; 2) Contato de *A. mellifera* com folhas de eucalipto tratadas; 3) Pulverização direta sobre *A. mellifera* e 4) Ingestão de pasta cãndi incorporada com os tratamentos. Avaliou-se a longevidade das operárias a partir de uma até 240 horas. Para a produção de rainhas foram executados dois ciclos: 1) *B. bassiana* ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) e água destilada esterilizada e 2) *M. anisopliae* ( $1 \times 10^8$  conídios.ml<sup>-1</sup>) e água destilada esterilizada. Para isso, foi realizada a transferência de larvas de operárias para cúpulas acrílicas contendo geleia real incorporada com os tratamentos, sendo a emergência das rainhas monitorada e análises morfométricas executadas. *Beauveria bassiana* provocou redução na longevidade das operárias apenas no bioensaio de pulverização direta e *Metarhizium anisopliae* causou redução da longevidade nos quatro bioensaios realizados. O óleo essencial de *E. uniflora* causou redução na longevidade das abelhas através da pulverização direta e ingestão de pasta cãndi e *P. cablin* reduziu a longevidade de *A. mellifera* nos bioensaios de contato em folhas de eucalipto, pulverização direta e ingestão de pasta cãndi, quando comparadas às operárias provenientes da testemunha. Na produção de rainhas não houve redução ou interferência nos parâmetros morfométricos avaliados, após ingestão de geleia real incorporada com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, tampouco no tempo de emergência, quando comparado às rainhas provenientes da testemunha. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *E. uniflora* foram calamen-10-ona, silfiperferol-6-em-5-ona, germacrona, germacreno B e os compostos encontrados no óleo essencial de *P. cablin* foram patchoulol,  $\alpha$ -guaiano e  $\gamma$ -patchouleno. *M. anisopliae* e os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* não são seletivos a *A. mellifera*, quando realizados bioensaios em laboratório, enquanto *B. bassiana* pode ser considerado seletivo. Entretanto, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em campo, mostraram-se seletivos e seguros para produção de rainhas de *A. mellifera*. Novos testes, com diferentes isolados dos fungos e diferentes concentrações dos tratamentos, e a campo, são recomendados.

**Palavras-chave:** Abelha africanizada. Controle biológico. Controle alternativo. Desordem do Colapso das Colônias.

## ABSTRACT

COLOMBO, Fernanda C. **SELECTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND ESSENTIAL OILS TO *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**. 2019. 81 p. Dissertation (MSc in Agroecosystems) – Graduate Program in Agroecosystems, Federal University of Technology - Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

Africanized *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) bees are social insects, considered useful due to their importance for agroecosystems. However, they are suffering from the colony collapse disorder and, among the suspects, stand out the synthetic chemical insecticides. Thus, as an alternative, there is the biological and alternative control of pests, however, the effects of entomopathogens and essential oils on bees are still scarce. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and the essential oils of *Eugenia uniflora* and *Pogostemon cablin* on africanized *A. mellifera* workers. For this, in the laboratory, four bioassays were performed with the entomopathogenic fungi ( $1 \times 10^8$  conidia.ml<sup>-1</sup>) and with the essential oils (0,75%): 1) *A. mellifera* contact on pulverized vitreous surface; 2) Contact of *A. mellifera* with treated eucalyptus leaves; 3) Direct spraying on *A. mellifera* and 4) Ingestion of candy paste incorporated with the treatments. The workers' longevity was evaluated from one to 240 hours. For the queens' production, two cycles were performed: 1) *B. bassiana* ( $1 \times 10^8$  conidia.ml<sup>-1</sup>) and sterilized distilled water and 2) *M. anisopliae* ( $1 \times 10^8$  conidia.ml<sup>-1</sup>) and sterilized distilled water. For this, the transfer of larvae from workers to acrylic cupules containing royal jelly incorporated with the treatments was performed, with the emergence of the queens monitored and morphometric analyzes executed. In addition, gas chromatography of the essential oils was performed to verify the major compounds of these oils. *Beauveria bassiana* caused reduction in the workers' longevity only in the direct spray bioassay and *Metarhizium anisopliae* caused reduction in the four bioassays tested. *Essential uniflora* essential oil caused a reduction in bees' longevity through direct spray and ingestion of candy paste and *P. cablin* reduced the longevity of *A. mellifera* in contact bioassays in eucalypt leaves, direct spray and ingestion of candy paste, when compared to workers from the control. In the queens' production there was no reduction or interference in the morphometric parameters evaluated after ingestion of royal jelly incorporated with *B. bassiana* and *M. anisopliae*, nor in the emergency time when compared to queens from the control. The major compounds found in the *E. uniflora* essential oil were calamen-10-one, silfiperferol-6-em-5-one, germacron, germacrene B and the compounds found in the essential oil of *P. cablin* were patchoulol,  $\alpha$ -guaene and  $\gamma$ -patchoulene. *M. anisopliae* and the essential oils of *E. uniflora* and *P. cablin* are not selective to *A. mellifera* when laboratory bioassays are performed, while *B. bassiana* can be considered selective. However, *B. bassiana* and *M. anisopliae*, in the field, were selective and safe for the production of *A. mellifera* queens. New tests, with different fungal isolates and different concentrations of the treatments, and in the field, are recommended.

**Key-words:** Africanized bee. Biological control. Alternative control. Colony collapse disorder.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1 ABELHAS E APICULTURA.....	12
2.1.1 <i>Apis mellifera</i> e a polinização .....	13
2.1.2 Morfologia e biologia de <i>A. mellifera</i> .....	14
2.1.3 Organização social de <i>A. mellifera</i> .....	16
2.1.4 Qualidade da rainha de <i>A. mellifera</i> .....	17
2.2 DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS .....	18
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO .....	19
2.3.1 Fungos entomopatogênicos .....	20
2.4 CONTROLE ALTERNATIVO.....	22
2.4.1 Óleos essenciais .....	23
<b>3 CAPÍTULO I – <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> AFETAM A SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS E A PRODUÇÃO DE RAINHAS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADA?</b> .....	26
INTRODUÇÃO .....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÃO.....	52
<b>4 CAPÍTULO II – TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eugenia uniflora</i> E <i>Pogostemon cablin</i> A OPERÁRIAS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADA</b> .....	53
INTRODUÇÃO .....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO .....	66
CONCLUSÃO.....	69
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) é um importante organismo nos ecossistemas, pois é responsável pela polinização da maioria das espécies vegetais cultivadas do mundo (CALDERONE, 2012; GARIBALDI et al., 2013; HUNG et al., 2018; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a) e mesmo nos locais onde não é nativa, como nas Américas, é usada para produzir e incrementar a produção vegetal (HUNG et al., 2018). Além da polinização realizada, esse inseto também é produtor de mel, geleia real, própolis, cera e apitoxina, produtos de importância econômica e úteis aos seres vivos (COUTO; COUTO, 2006).

O comportamento e o desenvolvimento de uma colônia de abelhas *A. mellifera* é uma relação complexa entre rainha, operárias e ambiente (BIENEFELD; REINHARDT; TIERHALTUNG, 2007). A rainha tem a função de ovipositar e produzir feromônios, enquanto as operárias realizam todas as atividades dentro e fora da colônia. A busca de alimento fora da colônia traz como benefício a polinização, fenômeno fundamental para a manutenção da biodiversidade vegetal e fornecimento de alimento para os animais. Dentre os animais polinizadores, os insetos são considerados como os principais, com destaque as abelhas *A. mellifera*, pois estas se alimentam exclusivamente de pólen e néctar e visitam uma ampla quantidade de flores por dia (CALDERONE, 2012; GIANNINI et al., 2015; POTTS et al., 2010).

No entanto, o mesmo ambiente que fornece pólen e néctar como alimento, nem sempre permite que a colônia sobreviva, pois no momento em que as operárias deixam a colônia para coleta de alimento, estas podem se contaminar com substâncias presentes no ambiente, os levando para a colônia e podendo provocar a contaminação de todos os indivíduos presentes (AMARO; GODINHO, 2012; CARVALHO et al., 2009). Com isso, pode ocorrer o enfraquecimento ou a morte das colônias, contribuindo para a Desordem do Colapso das Colônias (DCC).

A DCC tem como principal sintoma a perda de abelhas adultas em um curto espaço de tempo, encontrando na colônia excesso de crias em relação ao número de adultos, pouca ou nenhuma abelha morta dentro ou fora da colônia e ausência de outros insetos na colônia afetada (VANENGELSDORP et al., 2009, 2017; VANENGELSDORP;

UNDERWOOD; HAYES, 2007). As causas da DCC ainda são discutidas e não há apenas um motivo responsável pela perda das colônias, mas o uso incorreto e excessivo dos inseticidas químicos sintéticos é um dos fatores que pode estar contribuindo para a mortalidade das abelhas, pois estes agem sobre os insetos de diversas maneiras, por contato ou ingestão, afetando o olfato e o comportamento, dificultando o processo de polinização e de localização das colônias, além de causar a morte das abelhas por toxicidade (CATAE et al., 2017; FREITAS B. M., PINHEIRO, 2012; GONÇALVES; LIBARDONI, 2017; MARQUES, 2012; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012b). Produtos químicos da classe dos neonicotinoides, dos piretroides, dos organofosforados e os acaricidas são tóxicos às abelhas *A. mellifera*, pois afetam o sistema nervoso desses insetos, os levando a morte (BAPTISTA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009; CATAE et al., 2018; CHAIMANEE et al., 2016; GOÑALONS; FARINA, 2015; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014; SMODIŠ ŠKERL; KMECL; GREGORC, 2010; THANY et al., 2015; TOSI; NIEH, 2017).

Em substituição ao controle químico, para o controle de insetos-praga, têm-se o controle biológico (CB) e o controle alternativo com plantas inseticidas (CA), que são considerados mais seguros ao ambiente quando comparados ao inseticidas químicos sintéticos (GUPTA; DIKSHIT, 2010). O CB é um fenômeno natural e como função têm-se o controle de insetos com potencial de provocar dano econômico, através de seus inimigos naturais, como entomopatógenos e entomófagos (PARRA, 2014). Já o CA utiliza-se de compostos do metabolismo secundário de plantas que possuem potencial inseticida, para controle de insetos-praga, através do processamento de diversas maneiras, como: pós secos, extratos aquosos, alcoólicos, óleos essenciais, entre outros (ISMAN, 2015).

Dentre os entomopatógenos têm-se os fungos entomopatogênicos que causam doenças infecciosas nos insetos e possuem largo espectro de ação, com destaque a *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, 1912 que causa a doença branca nos insetos e é utilizado no controle de diversos insetos-praga e ácaros (PARRA, 2014; VAN LENTEREN et al., 2018) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok, 1883 conhecido por causar a doença verde nos insetos e apresentar patogenicidade para mais de 204 espécies de insetos (DESTÉFANO; DESTÉFANO; MESSIAS, 2004; PARRA, 2014; VAN LENTEREN

et al., 2018). Em relação ao CA têm-se os óleos essenciais, que possuem ampla diversidade de princípios químicos, como terpenos, aldeídos, fenóis, entre outros, que apresentam potencial repelente e inseticida (CAMPOS et al., 2018; KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008). Os óleo essenciais de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), conhecida por pitanga e *Pogostemon cablin* (Lamiaceae), patchouli, apresentaram potencial inseticida e repelente, sendo eficazes no controle de diversos insetos-praga (ALBUQUERQUE et al., 2013; COITINHO et al., 2010; DALLACORT, 2017; GOKULAKRISHNAN et al., 2013; JUNG et al., 2013; PAVELA, 2008; ROCHA et al., 2018; STENGER, 2017; ZHU et al., 2003).

Porém são necessários estudos testando a seletividade de produtos utilizados nestes métodos de controle sobre operárias e rainhas de *A. mellifera* africanizadas, simulando diferentes métodos de contato, tanto em laboratório, quanto à campo, para então serem considerados seguros no controle de insetos, sem que causem malefícios às abelhas. Ainda assim, é necessário verificar quais são os melhores métodos de aplicação à campo e qual o momento correto de aplicação, pois, caso os produtos sejam considerados seguros podem ser pulverizados no momento do florescimento das plantas, ou então, utilizados no momento em que a planta está no período vegetativo ou após o florescimento, momento em que não ocorre o forrageamento realizado pelas operárias (GAZZONI, 2017).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a seletividade de fungos entomopatogênicos e óleos essenciais à *A. mellifera*. Para isto, o trabalho foi realizado em duas etapas: 1) Avaliando-se a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizada quando em contato com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, por meio de quatro metodologias de aplicação, em laboratório, e a produção de rainhas, em campo. 2) Avaliando-se a toxicidade dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Pogostemon cablin* (patchouli) a operárias de *A. mellifera* africanizada, em laboratório, através de quatro metodologias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ABELHAS E APICULTURA

As abelhas são consideradas como as espécies polinizadoras mais importantes devido sua ampla distribuição, pois estão presentes em todas as regiões do mundo e por possuírem comportamento generalista de forrageamento (HUNG et al., 2018). Estes organismos, através da polinização de diversas espécies, garantem frutos e grãos de melhor qualidade (COUTO; COUTO, 2006; FREITAS; SILVA, 2016; GARIBALDI, 2013; RUCKER; THURMAN; BURGETT, 2012). Entretanto nem todas as espécies de abelhas são responsáveis pela produção de mel, geleia real, cera, apitoxina, produtos de valor medicinal e econômico, como as abelhas *A. mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) africanizadas (TAUTZ, 2010).

A apicultura (criação de abelhas com ferrão) no Brasil iniciou em 1839, quando algumas colônias de abelhas de *A. mellifera* europeia foram trazidas de Portugal para o Rio de Janeiro, pelo padre Antônio Carneiro (COUTO; COUTO, 2006). Já algumas outras raças de abelhas foram introduzidas após essa data, nas regiões Sul e Sudeste, através de imigrantes europeus. Nesta época, as abelhas europeias eram acometidas por doenças e pragas (insetos e ácaros) nas colônias, gerando prejuízos aos apicultores e, devido a isso, o pesquisador Dr. Kerr iniciou estudos sobre abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836. Em 1956, ele viajou até a África para selecionar rainhas africanas resistentes a doenças. Entretanto, algumas das colônias trazidas da África enxamearam e cruzaram com subespécies já existentes no Brasil, originando as abelhas africanizadas *A. mellifera* (RAMOS; CARVALHO, 2007).

As abelhas *A. mellifera* são conhecidas por serem insetos sociais devido a hierarquização nas colônias. Para a realização de todas as atividades é necessária a presença das três castas que compõem a colônia: rainha, zangões e operárias (COUTO; COUTO, 2006).

### 2.1.1 *Apis mellifera* e a polinização

A polinização, transferência dos grãos de pólen das estruturas masculinas das flores para a parte feminina, da mesma flor ou de uma outra flor da mesma espécie, é um fenômeno fundamental para manutenção da biodiversidade vegetal e fornecimento de alimento para os animais (CALDERONE, 2012; GIANNINI et al., 2015; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a; POTTS et al., 2010). Dentre todas as espécies de plantas conhecidas atualmente, aproximadamente 87% destas necessitam da polinização realizada por seres vivos, denominados polinizadores (FREITAS; SILVA, 2016; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a; OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Os polinizadores visitam as flores em busca de pólen, néctar, resina, entre outros e durante a coleta desses recursos, acabam entrando em contato acidental ou propositalmente com o pólen, levando-o consigo, retido em seu corpo, transferindo então para outras flores, realizando o serviço conhecido como polinização (CALDERONE, 2012; CALVETE et al., 2010; RUCKER; THURMAN; BURGETT, 2012)

A polinização realizada por seres vivos, além de aumentar o volume da produção, também influencia na qualidade dos frutos, diminui a má-formação, aumenta o teor de óleos e ainda uniformiza o processo de amadurecimento reduzindo perda de colheitas, além de melhorar a qualidade da fisiologia das sementes produzidas e aumentar a variabilidade genética das plantas (CRUZ et al., 2005; FREITAS; SILVA, 2016; NASCIMENTO et al., 2012; OLIVEIRA; NICODEMO; OLIVEIRA, 2015).

Os insetos são os principais polinizadores da flora, ressaltando borboletas, mariposas, besouros, moscas, vespas, formigas, com destaque especial às abelhas, pois estas se alimentam exclusivamente de pólen e néctar e visitam uma ampla quantidade de flores por dia (o qual varia com a espécie da abelha e da flor visitada) para suprir suas necessidades e da colônia (CHIARI et al., 2008). Ainda são responsáveis por polinizar 50% das espécies de plantas das florestas tropicais e 80% das espécies vegetais do cerrado brasileiro (FREITAS; SILVA, 2016). Em relação as abelhas *A. mellifera*, por possuírem comportamento generalista de forrageamento, são apontadas como os insetos polinizadores de importância agrícola mais utilizados no mundo (HUNG et al., 2018; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a).

Na cultura da soja, por exemplo, 10% da polinização é realizada por insetos e dentre esses, 50% é realizado pelas abelhas (MORSE; CALDERONE, 2000). Quando a soja foi polinizada por *A. mellifera*, houve aumento de 37% na produtividade de grãos quando comparada à soja não polinizada (cultivares transgênica e convencional) (CHIARI et al., 2008).

Do mesmo modo, a polinização realizada por *A. mellifera* e por abelhas nativas em *Rubus* sp. (amoreira-preta) foi fundamental para a produção de frutos melhores e maiores (MELLO JUNIOR; ORTH; MORETTO, 2011) e em *Brassica napus* (canola), houve aumento na produção de sementes e incremento na produtividade em relação a polinização realizada manualmente (ROSA; BLOCHTEIN; LIMA, 2011). A polinização realizada por *A. mellifera* também é fundamental em outras espécies vegetais, como: *Persea americana* (abacate), *Anacardium occidentale* (caju), *Malus domestica* (maçã), *Fragaria vesca* (morango), *Capsicum annuum* (pimentão), *Cucumis melo* (melão), *Citrullus lanatus* (melancia), entre outros (CALVETE et al., 2010; FREITAS; SILVA, 2016), o que demonstra a importância desses organismos no incremento de produtividade de algumas culturas, evidenciando que é necessária atenção ao declínio dos polinizadores, evitando a extinção dessas espécies (SANFORD, 2003).

### 2.1.2 Morfologia e biologia de *A. mellifera*

As abelhas, por estarem na classe Insecta, possuem exoesqueleto constituído de quitina e o corpo dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se, externamente, os ocelos, os olhos compostos, as antenas e o aparelho bucal, que é do tipo lambedor. Este é formado por duas mandíbulas, que são utilizadas para alimentar as larvas, limpar os favos e auxiliar na defesa, e a língua (glossa), que é utilizada para coleta e transferência de alimento. Internamente se encontram as glândulas hipofaríngeas, que possuem função de produção da geleia real, as glândulas salivares, que auxiliam no processamento do alimento (néctar e mel) e as glândulas mandibulares, que auxiliam na produção de geleia real e estão relacionadas ao feromônio de alarme (COUTO; COUTO, 2006, CRUZ-LANDIM, 2009)

O tórax de *A. mellifera* é composto por três segmentos e em cada um há a presença de um par de pernas e os dois segmentos posteriores apresentam um par de asas cada. As pernas posteriores, denominadas coletoras, possuem uma estrutura com função de transporte de pólen e resinas, denominada corbícula. O abdome possui sete segmentos, onde estão presentes as estruturas que fazem parte do sistema digestório e o sistema ovipositor modificado, denominado ferrão, que está presente apenas nas rainhas e operárias (COUTO; COUTO, 2006). O sistema digestório das abelhas é dividido em três regiões: estomodeu ou intestino anterior, mesêntero ou ventrículo, e proctodeu ou intestino posterior. O mesêntero é considerado o estômago funcional dos insetos, pois apresenta invaginações e microvilosidades, que são responsáveis pela absorção dos nutrientes, aumentando a superfície de troca e aumento da absorção celular e é o local onde ocorre a maior parte da digestão (CRUZ-LANDIM, 2009).

Esses insetos são organismos considerados grandes quando comparadas aos outros da família Apidae, pois possuem, aproximadamente, 11 mm de comprimento, o abdome é largo, com quitinas escuras e contêm pelos. O ovo de *A. mellifera* é cilíndrico (1,6 mm de comprimento × 0,4 mm de altura, em média) e possui uma abertura, denominada micrópila, onde ocorre a penetração dos espermatozoides. A larva é vermiforme, possui 13 segmentos, apoda e áptera, não defecando no álveolo durante este período. O estágio larval apresenta cinco ínstaes antes de entrar na fase de pupa, na qual ocorre a troca da cutícula (COUTO; COUTO, 2006). No período de pupa as antenas, asas e pernas são evertidas, ocorre a distinção dos olhos compostos e peças bucais, formação de pêlos e separação da cabeça, tórax e abdômen, até a transformação em um indivíduo adulto (TAUTZ, 2010). O tempo de desenvolvimento das fases de ovo, larva, pupa até a transformação em adulto varia em cada casta (Quadro 1).

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

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

Fonte: Couto; Couto, 2006.



### 2.1.3 Organização social de *A. mellifera*

A colônia de abelhas da espécie *A. mellifera* é organizada por três diferentes castas, com funções distintas (GALLO et al. 2002; TAUTZ, 2010). 1) A rainha: maior indivíduo da colônia, possui função de manter a ordem social através da liberação de feromônios e realiza a postura dos ovos após o voo nupcial, que é o momento da cópula entre a rainha e os zangões (COUTO;COUTO, 2006). 2) Os zangões: são os indivíduos machos da colônia, possuem função de fecundar a rainha durante o voo nupcial e após a cópula morrem. A quantidade de zangões em uma colônia é variável em função da quantidade de alimento disponível e da época de acasalamento (TAUTZ, 2010). 3) As operárias: são os indivíduos em maior quantidade e são responsáveis pelo trabalho da colmeia, como limpeza, alimentação da rainha, coleta de néctar, defesa, produção de mel, geleia real e própolis. Estas apresentam funções diferentes conforme a idade e desenvolvimento glandular (COUTO; COUTO, 2006).

Nos cinco primeiros dias de vida realizam a limpeza dos alvéolos e das crias recém-emergidas, do 5º ao 10º dia são denominadas abelhas nutrizas, pois alimentam as larvas em desenvolvimento e é nessa idade que desenvolvem as glândulas hipofaríngeas e mandibulares. Do 11º ao 20º dia produzem cera para a construção dos favos e recebem e desidratam o néctar trazido pelas abelhas forrageiras, do 18º ao 20º dia também realizam a defesa da colônia e também auxiliam no controle de temperatura e do 22º dia em diante são denominadas abelhas campeiras ou forrageiras, pois realizam a coleta de pólen, néctar, água e resinas, porém as atividades podem variar conforme as necessidades da colônia (COUTO; COUTO, 2006; 2002; JOHNSON, 2008). Essa atividade de forrageamento realizada pelas operárias de *A. mellifera*, pode ser comprometida ou afetada devido a presença de substâncias químicas presentes no ambiente, causando enfraquecimento da colônia (AMARO; GODINHO, 2012; CARVALHO et al., 2009).

#### 2.1.4 Qualidade da rainha de *A. mellifera*

A sobrevivência de uma colônia, bem como seu crescimento e produtividade dependem da saúde e qualidade da rainha, do número de zangões que esta acasalou, além da liberação dos feromônios produzidos pela rainha, sendo responsáveis pelo equilíbrio e controle de umidade e temperatura dentro da colônia (AMIRI et al., 2017; KEELING et al., 2003; RANGEL; KELLER; TARPY, 2013; TARPY; PETTIS, 2013). A qualidade de uma rainha é o resultado de vários atributos físicos agindo em conjunto, como: peso, número de ovariolos, tamanho da espermateca, número de espermatozoides na espermateca, comprimento da asa e ausência de doenças e pragas, além de atributos comportamentais, como a liberação de feromônios (AMIRI et al., 2017; HATJINA et al., 2013).

A utilização de rainhas de qualidade superior à campo, ou seja, rainhas que acasalam com sucesso e produzem descendentes viáveis (GILLEY; TARPY; LAND, 2003) irá refletir em crias maiores e com maior longevidade, além de ser um fator fundamental para a sobrevivência de colônias populosas e para o funcionamento destas (TARPY; SIMONE-FINSTROM; LINKSVAYER, 2015). Além disso, o peso da rainha ao emergir também pode ser considerado como um indicador de qualidade reprodutiva, estando ligado ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas (HATJINA et al., 2013; TARPY; HATCH; FLETCHER, 2000), influência na longevidade da rainha (TAUTZ, 2010) e também está relacionado com a área de cria, pois rainhas mais pesadas possuem maior atividade de postura.

Outro fator é em relação ao forrageamento, pois quanto maior a área de cria, maior o estímulo para que as operárias realizem suas atividades, como coleta de alimento, e quanto maior a quantidade de alimento, principalmente para a rainha, maior será a produção de crias e a produção de mel (BIENEFELD; REINHARDT; TIERHALTUNG, 2007; OLDROYD; GOODMAN, 1990; VANENGELSDORP; OTIS, 2000; WOYKE, 1971). Devido a importância da utilização de rainhas de qualidade à campo para a apicultura, são necessários estudos a fim de verificar o efeito de agentes de controle de insetos na produção de rainhas, bem como na morfometria destas.

## 2.2 DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS

A polinização e os demais benefícios das abelhas podem ser comprometidos pela Desordem do Colapso das Colônias (DCC). A DCC se caracteriza pela rápida perda de abelhas adultas, excesso de crias em relação ao número de adultos da colônia, pouca ou nenhuma abelha morta dentro ou fora da colônia e ausência de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (traça-da-cera) ou outros insetos na colônia que foi afetada (VANENGELSDORP et al., 2009, 2017; VANENGELSDORP; UNDERWOOD; HAYES, 2007). O primeiro caso de DCC aconteceu no ano de 2006, nos Estados Unidos, onde milhares de colônias de abelhas *A. mellifera* foram perdidas, gerando prejuízos para a agricultura, devido à falta desses polinizadores (RUCKER; THURMAN, 2012; VANENGELSDORP; UNDERWOOD; HAYES, 2007).

No Brasil, o primeiro relato de perda das colônias foi em 2010, no estado de São Paulo, onde houve a perda repentina de colônias, com as mesmas características que foram observadas nos relatos dos apicultores americanos. Os estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina também já relataram perdas de colônias com esses sintomas (PIRES et al., 2016).

As causas para o acontecimento desse fenômeno ainda são discutidas. A maioria dos cientistas concorda que não existe uma única causa para a DCC, pois vários fatores podem interferir na perda das colônias, como: presença do ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000 (Parasitiformes: Varroidae), que se alimenta da hemolinfa das abelhas e pode ser vetor de vírus. Além do ácaro, a baixa variabilidade genética da rainha, o desmatamento, as mudanças climáticas, as toxinas químicas presentes no ambiente, o estresse nutricional, o manejo incorreto das colônias, os patógenos e o uso incorreto e excessivo de produtos químicos para o controle de pragas também são tidos como fatores que acarretam a DCC (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; JOHNSON et al., 2010; PILATIC, 2012; STAVELEY et al., 2014; VANENGELSDORP et al., 2017).

As abelhas, durante o forrageamento, podem se contaminar com produtos químicos, levando-os para dentro da colônia. Esses podem agir sobre *A. mellifera* de diversas maneiras, por contato ou ingestão, afetando o olfato e o comportamento,

dificultando o processo de polinização e de localização das colônias, além de levar à morte por toxicidade, sendo amplamente discutidos como fatores que podem gerar ou facilitar o processo de DCC (AMARO; GODINHO, 2012; FREITAS B. M., PINHEIRO, 2012; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012b; WATSON; STALLINS, 2016).

Diversos estudos com produtos químicos da classe dos neonicotinoides (ALIOUANE et al., 2009; BAPTISTA et al., 2009; CATAE et al., 2018; CHAIMANEE et al., 2016; GOÑALONS; FARINA, 2015; GREGORC; ELLIS, 2011; KRUPKE et al., 2012; LIBARDONI, 2017; OLIVEIRA et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2012; THANY et al., 2015; TOSI; NIEH, 2017), dos piretroides (BAPTISTA et al., 2009; LIBARDONI, 2017; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014) dos organofosforados (BAPTISTA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009) e acaricidas (SMODIŠ ŠKERL; KMECL; GREGORC, 2010) comprovaram que os mesmos são tóxicos à *A. mellifera*, afetando o sistema nervoso desses insetos e os levando a morte.

Como estratégia para minimizar ou evitar a mortalidade das abelhas, têm-se o uso do controle biológico e controle alternativo de pragas, que são considerados mais seguros ao ambiente, quando comparados aos produtos químicos (GALLO et al., 2002; GUPTA; DIKSHIT, 2010). Neste sentido, é relevante que testes para avaliar a seletividade e a segurança de produtos utilizados no controle biológico e no controle alternativo de pragas sejam realizados sobre *A. mellifera*, bem como sobre outras abelhas, como os realizados nessa dissertação de mestrado.

### 2.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é um fenômeno natural, que tem como função a redução de populações de insetos com potencial de provocar dano econômico, através de seus inimigos naturais (ERTHAL JUNIOR, 2011; GALLO et al., 2002). Esse método de controle surgiu em meados de 1200 a.C. na China, onde os agricultores utilizavam formigas para controlar lagartas desfolhadoras em pomares de citros (BALE; LENTEREN; BIGLER, 2007). Porém, o uso do controle biológico pode ser considerado efetivo em 1888, quando ocorreu a introdução da joaninha *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) para

controlar *Icerya purchasi* Maskell, 1878 (Hemiptera: Monophlebidae), considerada praga nos pomares de citros da Califórnia (PARRA, 2014).

O controle biológico pode ser realizado por entomófagos (parasitoides e predadores) e por entomopatógenos (fungos, vírus, bactérias e nematoides) (PARRA et al. 2002). Esse método é considerado mais seguro ao ambiente, quando comparado ao controle realizado por produtos químicos, pois são projetados para o controle de um inseto-praga específico, tendo como princípio a preservação dos inimigos naturais e demais organismos não-alvos que estão presentes no ambiente, são frequentemente eficazes em quantidades pequenas, possuem ação de controle mais prolongada pelo estabelecimento da população de inimigos naturais no ambiente e se decompõem rapidamente (GUPTA; DIKSHIT, 2010; MESSING; BRODEUR, 2018). Além disto, há a garantia de alimentos mais saudáveis (ALVES, 1998; MELO; AZEVEDO, 2000).

Entre os entomopatógenos utilizados no controle microbiano, têm-se os fungos entomopatogênicos, que causam doenças infecciosas nos insetos e possuem largo espectro de ação, pois são capazes de colonizar diversas espécies de insetos (ALVES, 1998).

### 2.3.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são agentes causadores das doenças mais comuns nos insetos em ecossistemas naturais (DALZOTO; UHRY, 2009; ERTHAL JUNIOR, 2011). Dentre os principais fungos entomopatogênicos, destacam-se *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok, 1883, os quais contaminam o inseto quando em contato com o tegumento e em condições favoráveis de umidade, temperatura, pH e nutrição (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018). Assim, quando o inseto entra em contato com o fungo entomopatogênico, os conídios penetram na cutícula do inseto e formam um tubo germinativo, atravessando o exoesqueleto através de uma estrutura de penetração, que é constituída pelo grampo de penetração e pelo apressório. Então, as células fúngicas absorvem os nutrientes dos insetos, destroem as células hospedeiras, produzem toxinas e o fungo se multiplica no interior do inseto, iniciando o processo de colonização (WANG; WANG, 2017). De 72 a

120 horas após o contato, o inseto está colonizado e o fungo emite as hifas externamente, através das aberturas e articulações do inseto morto, esporulando, para então iniciar outro ciclo de infecção (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018; SHAH; PELL, 2003).

*Beauveria bassiana* causa a doença branca nos insetos e no Brasil é utilizado para o controle de diversos insetos-praga e ácaros (PARRA, 2014; VAN LENTEREN et al., 2018). Os sintomas da doença são: manchas escuras no corpo do inseto, redução da alimentação, perda da coordenação motora, desorientação e, então, o inseto passa a ter coloração esbranquiçada (ALVES, 1998). *Metarhizium anisopliae* é conhecido por causar a doença-verde nos insetos e apresenta patogenicidade para mais de 204 espécies de insetos pertencentes as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera (DESTÉFANO; DESTÉFANO; MESSIAS, 2004; PARRA, 2014; VAN LENTEREN et al., 2018).

Como vantagem da utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm-se: largo espectro de ação, pois podem infectar insetos aquáticos e fitófagos em seus diferentes estágios de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto); a dispersão natural destes que possibilita a transmissão e a redução natural da praga, podendo afetar gerações futuras; além da infecção ocorrer por contato, enquanto que em outros patógenos a infecção ocorre apenas via oral (ALVES, 1998; THOMAS; READ, 2007). Devido a isso, são necessários estudos para avaliar possíveis efeitos em organismos não-alvos, como às abelhas *A. mellifera*, as quais apresentam relatos de DCC. Alguns trabalhos já foram realizados a fim de verificar a seletividade dos fungos entomopatogênicos a esses insetos.

Diferentes isolados do fungo *B. bassiana* diminuem a sobrevivência ou causam a mortalidade de pupas e operárias de *A. mellifera*, através de diferentes métodos de aplicação (AL MAZRA'AWI, 2007; ALVES et al., 1996; GARCÍA-FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008; HAMIDUZZAMAN et al., 2012; MEIKLE et al., 2007; POTRICH et al., 2018). Já outros isolados desse mesmo fungo entomopatogênico não causam redução na longevidade das abelhas, além de não afetarem a saúde da colônia em relação ao peso, peso das abelhas adultas e de cria e a produção de mel (AL MAZRA'AWI, 2007; AL MAZRA'AWI et al., 2006; GARCÍA-

FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008; MEIKLE et al., 2008).

Isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, quando testados por diferentes métodos de aplicação, como quando em contato com placas de petri, contato em folhas de soja e pulverização direta causam mortalidade de operárias de *A. mellifera* e redução na longevidade das abelhas (ALVES et al., 1996; POTRICH et al., 2018). Porém esse mesmo fungo, é inofensivo às abelhas adultas e crias. O desenvolvimento das colônias também não é afetado quando este fungo é testado à campo, além disso, quando outros isolados de *M. anisopliae* são testados, através de diferentes métodos de aplicação (à campo, pulverizados na área de cria e em laboratório, quando incorporados em folhas de soja) não causam redução na sobrevivência das abelhas (AHMED; ABD-ELHAY, 2013; KANGA et al., 2010; KANGA; JONES; GRACIA, 2006; KANGA; JONES; JAMES, 2003; POTRICH et al., 2018).

A utilização do controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos pode minimizar os efeitos adversos dos inseticidas químicos sintéticos, principalmente os efeitos negativos causados às abelhas *A. mellifera*. Devido a isso, são necessários testes dos produtos utilizados no controle biológico, para verificar a seletividade à organismos não-alvos, antes de aplicá-los na cultura de interesse, pois novos agentes de controle são constantemente lançados no mercado e o número de organismos não-alvos é expressivo (MESSING; BRODEUR, 2018). Além disso, destaca-se que a maioria dos trabalhos desenvolvidos têm sido realizados com abelhas europeias ou africanas, sendo poucos os trabalhos realizados com *A. mellifera* africanizada. Assim, verifica-se a importância de estudos testando a seletividade de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos à operárias e rainhas de *A. mellifera* africanizadas, através de diferentes métodos de aplicação, simulando as condições encontradas em campo, tanto em laboratório, quanto à campo.

## 2.4 CONTROLE ALTERNATIVO

O controle alternativo com plantas inseticidas começou a ser utilizado 2000 a.C. na Índia, para o controle de pragas. No Egito esse método de controle também era

utilizado para o controle de pragas de grãos armazenados. No século 16, os europeus faziam uso de plantas com potencial inseticida para o controle de pragas (THACKER, 2002). Esse método de controle é proveniente de compostos do metabolismo secundário de plantas que possuem potencial inseticida. Esses compostos não possuem função estrutural ou de crescimento no vegetal, mas podem ser responsáveis pela defesa contra possíveis doenças ou pragas (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008; VIZZOTTO, 2010).

O controle alternativo vem sendo cada vez mais estudado pela segurança ao homem e aos animais, além de manter o equilíbrio natural dos ecossistemas. Como vantagem desse método de controle têm-se: toxicidade à patógenos; inibição da alimentação dos insetos; perturbação no crescimento, desenvolvimento, reprodução, diapausa e comportamento dos insetos; ação repelente e inseticida; ação na síntese de quitina; além de afetarem o sistema nervoso central (AGUIAR-MENEZES, 2005; CHEGINI et al., 2018; CHEGINI; ABBASIPOUR, 2017; COSME; CARVALHO; MOURA, 2007; MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009; VIZZOTTO, 2010). Para utilização das plantas com potencial inseticida no controle de pragas, essas podem ser processadas de diferentes maneiras, como pós secos, extratos aquosos, alcoólicos e os óleos essenciais (ISMAN, 2015).

#### 2.4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, frutos, flores e caule e possuem características lipofílicas, voláteis e odoríferas. Estes possuem ampla diversidade de princípios químicos, tais como terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros, que são utilizados de diversas maneiras (medicinal e cosméticos), além de apresentarem potencial repelente e inseticida (CAMPOS et al., 2018; KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008).

Inicialmente os estudos sobre óleos essenciais foram utilizados para a obtenção de fragrâncias e como constituintes de inseticidas à base de piretroides. Tais óleos agem de forma tóxica nas características bioquímicas e fisiológicas dos insetos (BAKKALI; IDAOMAR, 2008; CARVALHO et al., 2017) Os terpenos, piretrina, rotenona, nicotina e toxafeno são tóxicos e já utilizados como inseticidas ou modelos para inseticidas



comerciais (DAMBOLENA et al., 2016), porém são necessários novos estudos para avaliar o efeito de óleos essenciais tanto sobre insetos-praga, como sobre organismos não-alvo, para então configurar-se como um novo ramo de aplicação para tais óleos, de uma forma sustentável e que promova o desenvolvimento de tecnologia limpa e segura para os ecossistemas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais apresentam vantagens quando comparado às demais formas de extração, pelo fato de conter a totalidade dos princípios ativos que possuem potencial inseticida (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Estes também apresentam vantagens quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos, como: rápida degradação, baixa toxicidade aos mamíferos, seletividade aos insetos-pragas e baixa fitotoxicidade. As desvantagens estão no âmbito econômico e na dificuldade de extração, devido a necessidade de grande quantidade de material vegetal, fator que interfere diretamente na utilização deste método de controle nas pequenas propriedades (MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012). Porém, a utilização de plantas nativas ou exóticas com adaptação às condições climáticas, e que tenham ampla distribuição territorial, pode facilitar a extração devido a disponibilidade de material vegetal, viabilizando assim a extração, até mesmo em pequenas propriedades. Dessa forma, testes com plantas que atendam os requisitos citados anteriormente são necessários, a fim de verificar o efeito inseticida e repelente de tais plantas, bem como a toxicidade à organismos-não alvo, como as abelhas *A. mellifera*.

*Eugenia uniflora*, conhecida popularmente como pitanga, é uma planta pertencente à família Myrtaceae e nativa da mata atlântica brasileira. Por possuir fácil adaptação, é encontrada de cinco até 1650 metros de altitude. É considerada uma árvore de porte médio e varia de dois a quatro metros de altura, dependendo das condições do solo (SILVA, 2006). Alguns estudos já foram realizados a fim de verificar o efeito inseticida e repelente de pitanga no controle de insetos-praga.

O óleo essencial de *E. uniflora* foi eficaz quando testado para o controle de diferentes insetos-praga, como *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) *Atta laevigata* Smith (Hymenoptera: Formicidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) (COITINHO et al., 2010; JUNG et al., 2013; STENGER, 2017), demonstrando seu potencial inseticida.

Já *Pogostemon cablin* (Lamiaceae), patchouli, é nativo das Filipinas e é uma planta arbustiva, perene, adaptada a condições climáticas quentes e úmidas. A planta é conhecida pela facilidade de extração do óleo essencial de suas folhas, para utilização nas indústrias de perfumaria e cosmética, além de possuir atividade antibacteriana, antioxidante, inseticida e repelente contra insetos (ALBUQUERQUE et al., 2013; PAVELA, 2005; WEI; SHIBAMOTO, 2007).

Estudos já foram realizados a fim de verificar efeito repelente e inseticida de *P. cablin* no controle de insetos-praga, como a três espécies de formigas cortadeiras do gênero *Atta*, *A. sexdens* L., *A. opaciceps* Borgmeier e *A. sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), mosca doméstica *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), cupins *Coptotermes formosanus* Shiraki (Blattodea: Rhinotermitidae), três espécies de formigas urbanas *Camponotus melanoticus* Emery, *Camponotus novograndensis* e *Dorymyrmex thoracicus* Gallardo (Hymenoptera: Formicidae), *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) e *T. peregrinus*, o qual se mostrou tóxico e eficaz (ALBUQUERQUE et al., 2013; DALLACORT, 2017; GOKULAKRISHNAN et al., 2013; PAVELA, 2008; ROCHA et al., 2018; ZHU et al., 2003).

Devido ao potencial dos óleos essenciais para o controle de insetos-praga e as vantagens que estes apresentam, a utilização destes se mostra como uma estratégia eficaz para o controle de insetos-praga em pequenas propriedades. No entanto, não há na literatura estudos avaliando o efeito de *E. uniflora* e *P. cablin* a *A. mellifera*, portanto, são necessários estudos a fim de verificar o efeito destes sobre organismos não-alvo e de importância econômica e ambiental, como *A. mellifera* africanizada.

### **3 CAPÍTULO I – *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* AFETAM A SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS E A PRODUÇÃO DE RAINHAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA?**

#### **INTRODUÇÃO**

A utilização de inseticidas químicos sintéticos vem aumentando devido à resistência dos insetos e ressurgência de pragas (TOMASETTO et al., 2017; YU; POWLES, 2014), acarretando em problemas ambientais como a contaminação das águas, do solo, dos lençóis freáticos, e os resíduos em alimentos (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014; HOWARD; ALLEN, 2010), além de, em alguns casos, não serem seletivos a inimigos naturais e a organismos não-alvos, como os polinizadores, principalmente as abelhas *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae).

O uso incorreto e exacerbado de inseticidas químicos sintéticos é um dos fatores apontados como responsável por causar a Desordem do Colapso das Colônias (DCC) de *A. mellifera* (FAROOQUI, 2013; KURWADKAR; EVANS, 2016; PIRES et al., 2016). Esse fenômeno é conhecido pelo desaparecimento das abelhas e perda rápida das colônias e causa preocupação mundial, devido a importância das abelhas desta espécie na polinização de vegetais (POTTS, 2015; VANENGELSDORP et al., 2017).

A contaminação das abelhas com os produtos presentes no ambiente ocorre no momento do forrageamento, que é quando as operárias saem da colônia para coleta de alimento e água e acabam entrando em contato com os resíduos químicos dos agentes de controle (AMARO; GODINHO, 2012; WATSON; STALLINS, 2016). Quando estes produtos estão em concentrações muito altas podem causar a morte imediata das abelhas e quando em doses menores podem levá-las a perder a direção sem conseguirem voltar para a colônia (CARVALHO et al., 2009; FAROOQUI, 2013; HENRY et al., 2012), e no caso de voltarem, acabam levando esses produtos para dentro da colônia, podendo alimentar a rainha com geleia real contaminada, levando ao enfraquecimento e até mesmo a morte (AMARO; GODINHO, 2012). Com isso, são necessárias estratégias para reduzir a utilização de produtos que causam o declínio dos polinizadores.

Uma das alternativas para o controle de pragas, minimizando possíveis impactos no ambiente, é a utilização do controle biológico, por ser considerado mais seguro, quando comparado ao controle realizado utilizando-se produtos químicos (GUPTA; DIKSHIT, 2010). No controle biológico de insetos, têm-se os fungos entomopatogênicos, que são conhecidos por possuírem largo espectro de ação além de causarem doenças infecciosas nos insetos (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018).

Os principais fungos utilizados são *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok, 1883, que colonizam os insetos através do contato (ALVES, 1998; VAN LENTEREN et al., 2018). Devido a este modo de ação dos fungos, no momento do forrageamento, as abelhas *A. mellifera* podem entrar em contato com estes e se contaminar, os levando para a colônia e até mesmo alimentando a rainha com geleia real contaminada com esses organismos. Sendo assim, estudos são necessários a fim de verificar o efeito dos fungos entomopatogênicos sobre *A. mellifera*. Diferentes isolados de *B. bassiana* diminuíram a sobrevivência de pupas e a longevidade de operárias de *A. mellifera* (AL MAZRA'AWI, 2007; ALVES et al., 1996; GARCÍA-FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008; HAMIDUZZAMAN et al., 2012; POTRICH et al., 2018). Porém outros isolados do mesmo fungo não causaram mortalidade e nem interferência na longevidade das operárias de *A. mellifera*, bem como não afetaram a saúde da colônia (AL MAZRA'AWI et al., 2006; GARCÍA-FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008; MEIKLE et al., 2007, 2008).

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* causou a mortalidade de operárias de *A. mellifera* quando avaliado em diferentes métodos de contato (ALVES et al., 1996; POTRICH et al., 2018). Entretanto este mesmo fungo, porém utilizando isolados diferentes, foi inofensivo às pupas, crias, operárias e ao desenvolvimento da colônia de *A. mellifera* (AHMED; ABD-ELHAY, 2013; KANGA et al., 2010; KANGA; JONES; GRACIA, 2006; KANGA; JONES; JAMES, 2003). Verifica-se divergência entre os resultados de trabalhos que avaliaram o efeito de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *A. mellifera*. Possivelmente esses resultados sejam devido a utilização de diferentes isolados, bem como diferentes métodos de aplicação. Por isso, testes com diferentes isolados de entomopatógenos, simulando o que poderá ocorrer à campo, são necessários.

Estudos avaliando a influência de agentes de controle, como os fungos entomopatogênicos, na produção de rainhas de *A. mellifera* são pouco elucidados, sendo insuficientes os trabalhos nesta área, assim, destaca-se a importância de avaliar a influência destes na qualidade de rainhas, a fim de que possam ser utilizados com segurança à campo. Além disso, novos agentes de controle de insetos-praga, como diferentes isolados de fungos entomopatogênicos, estão sendo constantemente lançados no mercado, deste modo, testes para verificar a seletividade desses agentes à operárias e rainhas de *A. mellifera* são fundamentais, bem como testes com diferentes metodologias de aplicação e contato, para que os mesmos possam ser utilizados no controle de insetos-praga, sem causar impactos negativos às abelhas. Isto posto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na sobrevivência de operárias e na produção de rainhas de *A. mellifera*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos fungos entomopatogênicos e das operárias de *A. mellifera*

Os fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios foram *B. bassiana* isolado IBCB 66 e *M. anisopliae* isolado IBCB 425, ambos cedidos por empresa parceira, utilizados na concentração recomendada pelo fabricante ( $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>) e utilizados no controle de insetos-praga em diversas culturas (AGROFIT, 2018; LORENCETTI et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

As operárias de *A. mellifera* africanizada foram obtidas a partir de favos tipo Langstroth de cria operculada, provenientes do Apiário Experimental da UNEPE Apicultura da UTFPR-DV. Os favos foram alocados em colmeias escolhidas a partir da qualidade e quantidade de oviposição da rainha. Quando foi observada a presença de ovos de um dia, iniciou-se a contagem até o 19º dia, momento em que os favos foram retirados do apiário, acondicionados em sacos de papel Kraft (60×70 cm com gramatura 50 mm), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico I, onde foram alocados em câmara climatizada ( $30 \pm 2$  °C e U.R de  $60 \pm 10\%$ ) para simular

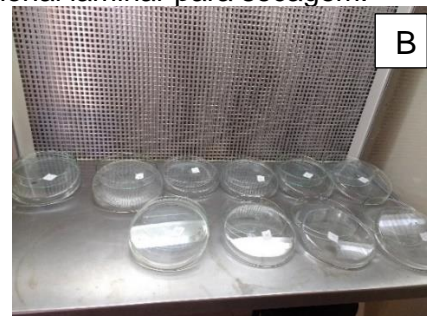
o ambiente da colmeia de origem, até sua emergência, obtendo-se operárias de idade padronizada.

Bioensaio 1: Contato de *A. mellifera* com superfície vítrea pulverizada com os fungos entomopatogênicos

Os tratamentos utilizados nos bioensaios 1, 2, 3 e 4 foram: Tratamento 1: *B. bassiana* ( $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>); Tratamento 2: *M. anisopliae* ( $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>) e como testemunha utilizou-se água destilada esterilizada.

Foram pulverizados 290  $\mu$ L dos tratamentos (volume baseado na área da placa na qual a solução foi pulverizada em relação ao volume de calda por hectare) em placas de petri de vidro (15 cm de diâmetro  $\times$  1,5 cm de altura). Para a pulverização, utilizou-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Tecnal<sup>®</sup> (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm) (Figura 1A). Posteriormente, essas placas foram dispostas em câmara de fluxo unidirecional laminar (VECO) para a evaporação completa da água, em seguida, as placas foram montadas de forma que houvesse fluxo de ar (Figura 1B) (metodologia adaptada de Carvalho et al. 2009).

**Figura 1** - A) Bomba de pressão utilizada para realizar a pulverização dos tratamentos; B) Placas de petri dispostas em câmara de fluxo unidirecional laminar para secagem.



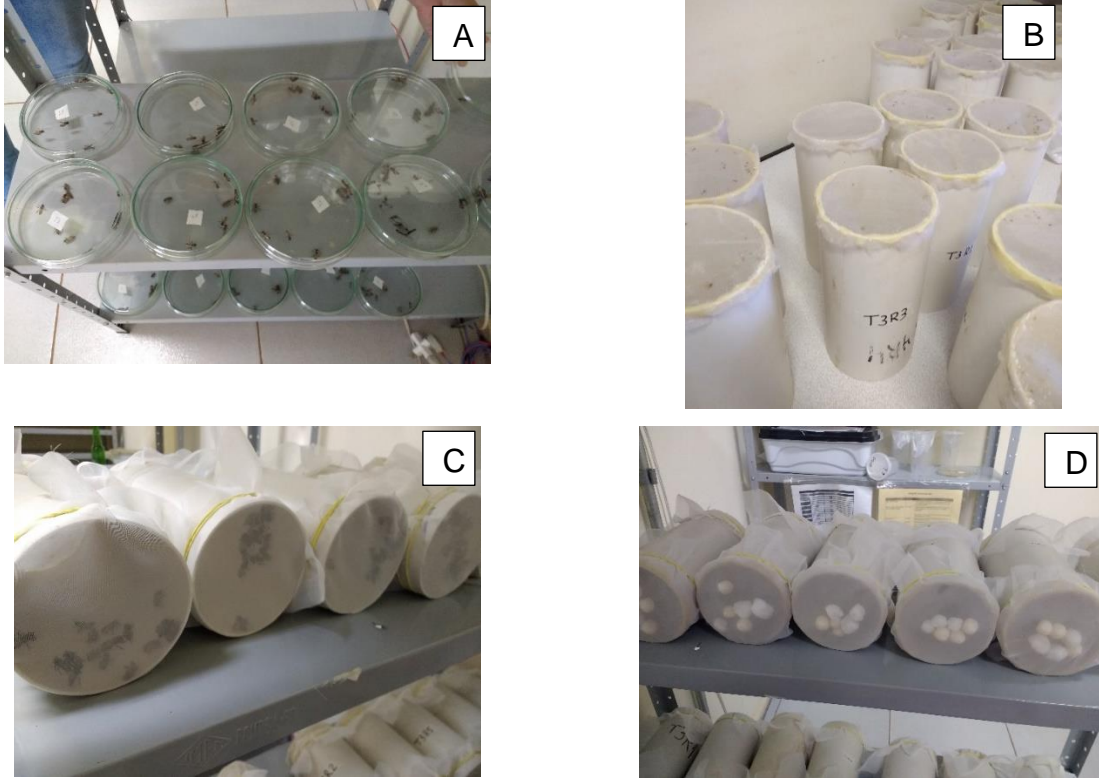
Fonte: Aatoria própria, 2018.

Assim, dez operárias de *A. mellifera* recém-emergidas, foram previamente anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por 120 segundos e então inseridas no interior dessas placas sobrepostas (Figura 2A). Após duas horas de contato com os tratamentos, as abelhas foram transferidas, em grupos de 20 indivíduos para gaiolas de PVC (20 cm de altura  $\times$

15 cm de Ø), sendo posteriormente cobertos com tecido *voile*. Sobre o tecido foi adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (açúcar de confeitiro e mel) (Figura 2B e 2C) (Metodologia adaptada de Brighenti et al., 2007). As gaiolas de PVC contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E) (Figura 2D).

Cada gaiola contendo 20 operárias foi considerada como uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição. A mortalidade das operárias foi avaliada a partir de uma, duas, três, quatro, cinco, seis, nove, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 até 240 horas após a pulverização dos tratamentos, realizando a contagem dos insetos mortos (metodologia adaptada de Baptista et al., 2009). As operárias mortas provenientes dos tratamentos com os fungos entomopatogênicos foram submetidas à câmara úmida, para confirmação da mortalidade pelo fungo (ALVES, 1998).

**Figura 2** - A) Abelhas *A. mellifera* em contato com superfície vítrea pulverizada com os fungos entomopatogênicos; B) Gaiolas de PVC para alocação das operárias de *A. mellifera* após duas horas de contato com os fungos entomopatogênicos; C) Operárias alocadas nas gaiolas de PVC; D) Gaiolas de PVC contendo as operárias, pasta cândi e algodão embebido em água destilada, em sala climatizada ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E).



Fonte: Autoria própria, 2018.

### Bioensaio 2: Contato de *A. mellifera* com folhas de eucalipto tratadas com os fungos entomopatogênicos

Folhas de *Eucalyptus dunnii*, sem tratamento fitossanitário, foram coletadas e imersas por cinco segundos nos tratamentos, em seguida, foram alocadas em câmara de fluxo unidirecional laminar (VECO) para evaporação completa da água. Na sequência, estas folhas foram dispostas em caixas gerbox (11×11×3,5 cm) (Figura 3A e 3B). Operárias recém-emergidas de *A. mellifera*, anestesiadas com CO<sub>2</sub> por 120 segundos, foram inseridas no interior das caixas gerbox, juntamente com as folhas de eucalipto tratadas (Figura 3C e 3D).



**Figura 3** - A) Imersão das folhas de eucalipto nas soluções dos fungos entomopatogênicos; B) Secagem das folhas em câmara de fluxo laminar unidirecional; C e D) Contato das operárias de *A. mellifera* com as folhas tratadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.



Fonte: A autoria própria, 2018.

Após duas horas de contato com as folhas de eucalipto, que foram imersas nos tratamentos, as abelhas foram transferidas em grupos de 20 indivíduos para gaiolas de PVC (20 cm de altura  $\times$  15 cm de  $\varnothing$ ), sendo posteriormente cobertos com tecido *voile*, adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (metodologia adaptada de Brighenti et al., 2007).

Cada gaiola contendo 20 operárias foi considerada como uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição. As condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no Bioensaio 1.

### Bioensaio 3: Pulverização dos fungos entomopatogênicos sobre operárias de *A. mellifera*

Operárias recém-emergidas de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO<sub>2</sub> por 120 segundos, foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, em grupos de

10 indivíduos. Cada grupo foi pulverizado com 290 µL do tratamento, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Tecnal<sup>®</sup> (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm<sup>2</sup>). O mesmo procedimento foi realizado para todos os tratamentos/repetições.

Após a pulverização, as operárias foram transferidas, em grupos de 20 indivíduos, para gaiolas de PVC (20 cm de altura × 15 cm de Ø) sendo, posteriormente, cobertos com tecido *voile*, adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (açúcar de confeitiro e mel) (metodologia adaptada de Brighenti et al., 2007). As condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no Bioensaio 1.

#### Bioensaio 4: Fungos entomopatogênicos incorporados à pasta Cândi

Vinte operárias recém emergidas de *A. mellifera* foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por 120 segundos, e acondicionadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura × 15 cm de Ø), sendo posteriormente cobertos com *voile* e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água. Como alimento foi fornecido às operárias pasta Cândi acrescida dos tratamentos (POTRICH et al., 2018).

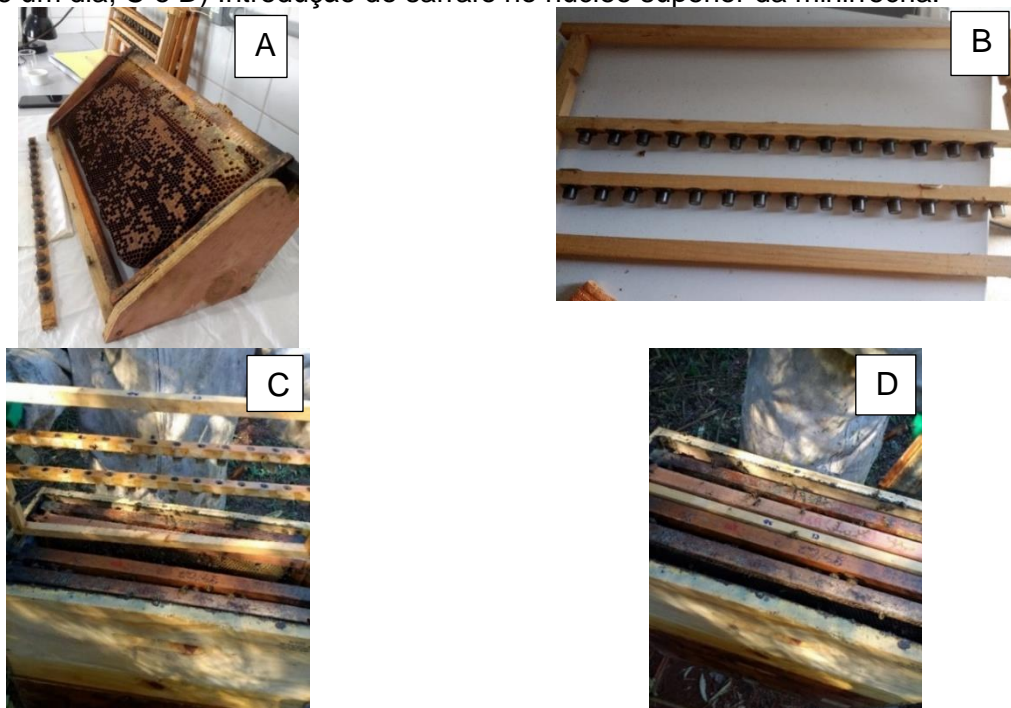
A pasta Cândi deste bioensaio foi preparada, individualmente, para cada tratamento. Para *B. bassiana* foi realizada uma mistura de 50 g de açúcar de confeitiro, 10 mL de mel puro e 0,05g de pó do fungo e para *M. anisopliae* misturou-se 50 g de açúcar de confeitiro, 10 mL de mel puro e 0,17g de pó do fungo, até formar uma massa homogênea. Como testemunha utilizou-se a pasta Cândi pura (sem adição dos tratamentos). Cada gaiola contendo 20 operárias foi considerada como uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição. As condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no Bioensaio 1.

#### Bioensaio 5: Fungos entomopatogênicos sobre a morfometria de rainhas de *A. mellifera*

Foram produzidas rainhas pelo método de Doolittle (1889), que consiste na transferência de larvas de operárias para cúpulas acrílicas contendo geleia real. Na geleia real foram adicionados os tratamentos (água destilada esterilizada, *B. bassiana* e *M. anisopliae*), para que as larvas se alimentassem da geleia contendo os tratamentos. As soluções dos fungos entomopatogênicos foram utilizadas conforme concentração recomendada pelo fabricante ( $1 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>). A idade das larvas foi padronizada de 0 a 24 horas, pois segundo Tarpy et al. (2000) as larvas de *A. mellifera* mais jovens originam rainhas maiores.

Para a transferência de larvas para cúpulas acrílicas e obtenção de rainhas de *A. mellifera* (Figura 4A) foram realizados dois ciclos de transferência. Ciclo 1: 168 cúpulas com geleia real incorporada com água destilada e 168 cúpulas com geleia real incorporada com a solução do fungo entomopatogênico *B. bassiana* e Ciclo 2: 168 cúpulas com geleia real incorporada com água destilada e 168 cúpulas com geleia real incorporada com a solução do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. As transferências foram realizadas com temperatura média de 30 °C e umidade relativa média de 70%. As cúpulas acrílicas, contendo uma larva de operária de *A. mellifera* cada, foram alocadas em um sarrafo, no núcleo superior de cada minirrecria, compostos de dois núcleos sobrepostos separados por uma tela excludora, totalizando 12 minirrecrias por ciclo (Figura 4B, 4C e 4D).

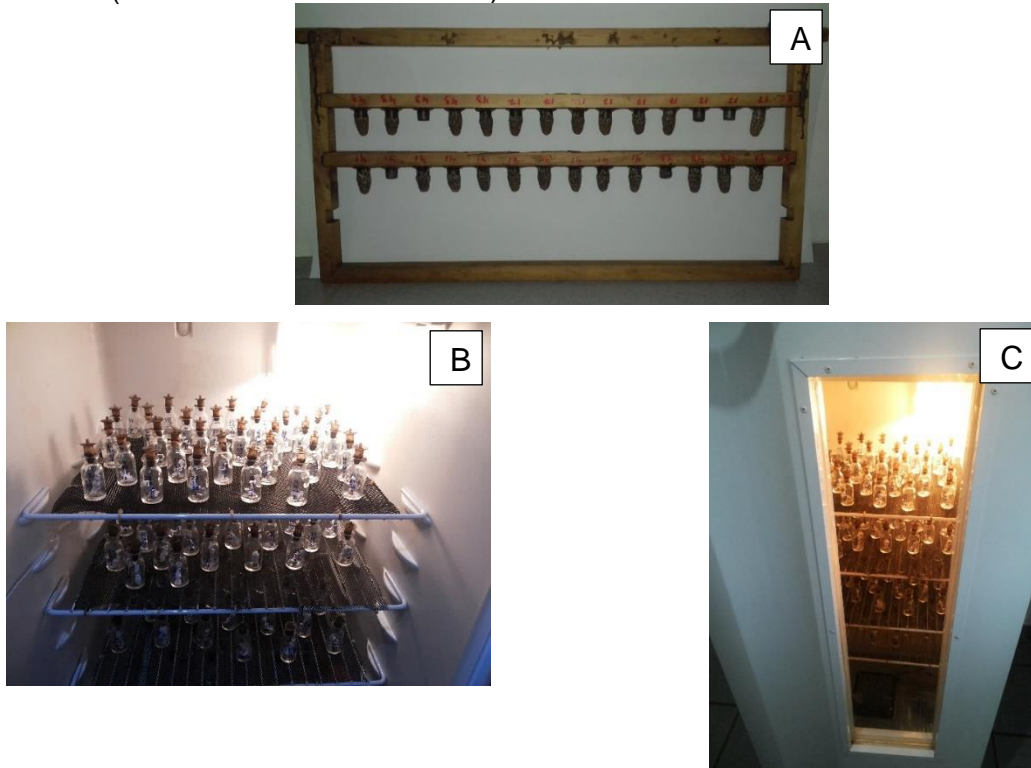
**Figura 4** - A) Cúpulas de acrílico e favo do tipo langstroth contendo as larvas de *A. mellifera* de um dia para produção de rainhas; B) Sarrafo contendo as cúpulas com as larvas de *A. mellifera* de um dia; C e D) Introdução do sarrafo no núcleo superior da minirrecria.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Dois dias após a transferência de larvas, foi realizada a contagem das realeiras para quantificar a aceitação das larvas (Figura 5A). Nove dias após a transferência das larvas, as realeiras foram retiradas das minirrecrias, alocadas verticalmente em frascos de vidro de 20 mL esterilizados, contendo papel e alocados em estufa para a criação de rainhas ( $34 \pm 2^\circ\text{C}$  e U. R. de  $60 \pm 5\%$ ) (Figura 5B e 5C).

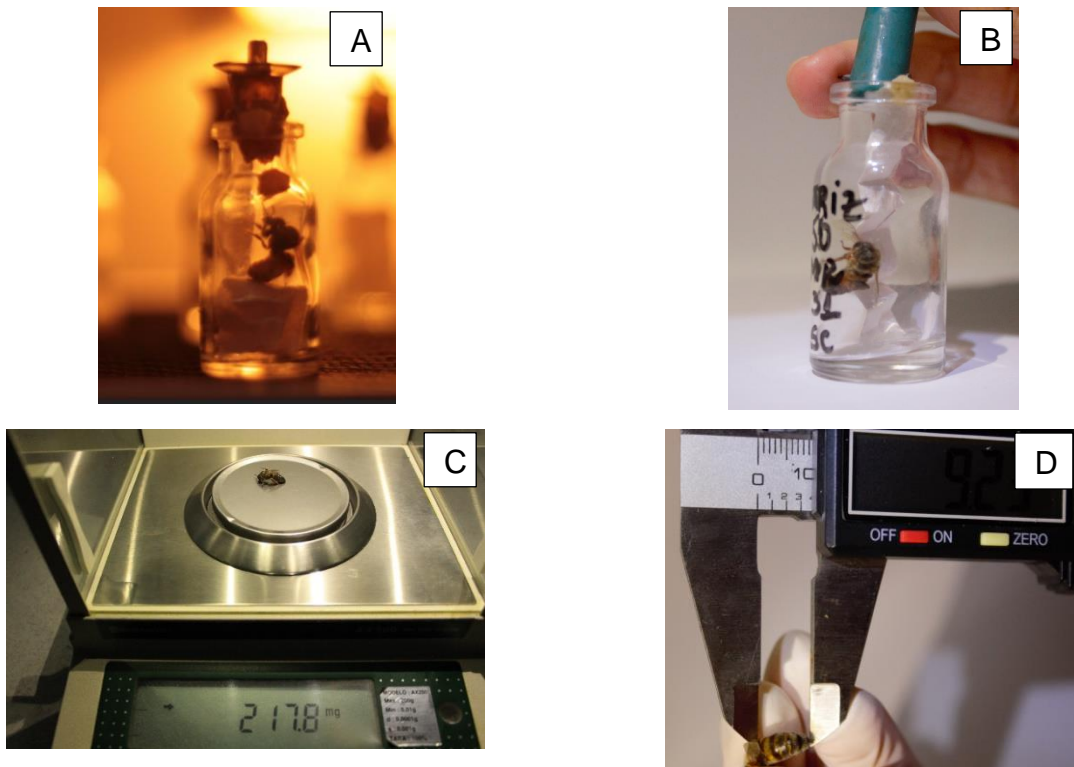
**Figura 5** - A) Contagem das realeiras para quantificar a aceitação das larvas de *A. mellifera*; C e D) Frascos de vidro, contendo uma realeira em cada, alocados em estufa para emergência das rainhas ( $34 \pm 2^\circ\text{C}$  e U. R. de  $60 \pm 5\%$ ).



Fonte: Autoria própria, 2018.

A emergência das rainhas de *A. mellifera* foi monitorada de 10 em 10 minutos (Figura 6A, B) e, no momento da emergência, estas foram anestesiadas com  $\text{CO}_2$ , por 120 segundos para determinação das medidas de peso vivo (mg) (Balança Shimadzu/AX-200) (Figura 6C), comprimento total, comprimento e largura de abdome, comprimento e largura de asa, comprimento, largura e altura do tórax (mm). Para a realização das mensurações utilizou-se um paquímetro digital Kingtools 502.150BL (Figura 6D).

**Figura 6** - A) Emergência de rainha de *A. mellifera*; B) Rainha sendo anestesiada com  $\text{CO}_2$ ; C) Determinação do peso à emergência em balança digital; D) Mensuração do comprimento do abdome de *A. mellifera* com paquímetro digital.



Fonte: Paulo Korb, 2018.

### Análise estatística

Os dados dos bioensaios 1, 2, 3 e 4 foram submetidos à análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e as médias comparadas entre si pelo teste de Dun, à nível de 95% de credibilidade, na sequência foi realizada análise de sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier, com auxílio do software estatístico R®.

As médias dos dados provenientes do experimento de fungos entomopatogênicos na morfometria de rainhas de *A. mellifera* foram submetidos ao teste T de Student e posteriormente foi realizada análise discriminante, pelo método Discriminante Linear de Fisher (JOHNSON; WICHERN, 2007), utilizando o software estatístico ©Copyright IBM Corporation, versão 20 (IBM SPSS, 2011).

## RESULTADOS

Verificou-se que *B. bassiana* causou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* no bioensaio de pulverização direta (159,3 horas), quando comparado a testemunha (177,4 horas) (Tabela 1). Já *M. anisopliae* reduziu a longevidade das operárias nos quatro os bioensaios realizados (73,35, 117,74, 139,86 e 126,9 horas, respectivamente) quando comparado as respectivas testemunhas (90,43, 157,44, 177,4 e 183,6 horas, respectivamente) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Longevidade média (em horas)  $\pm$  EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após serem submetidas a quatro bioensaios com *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

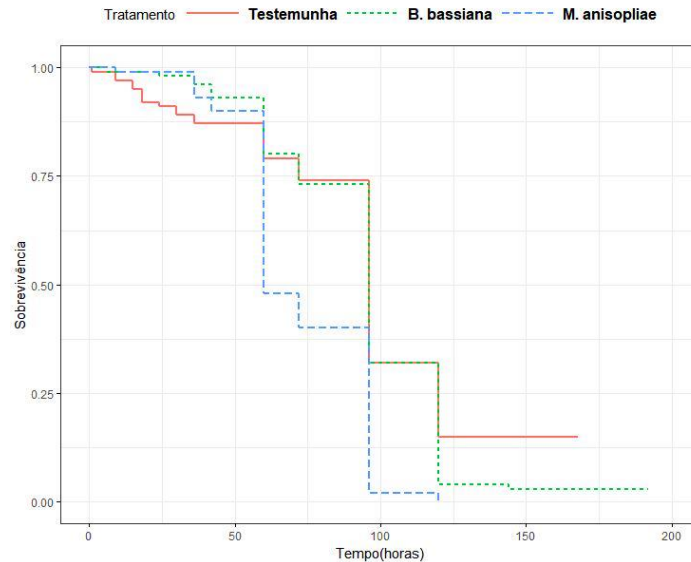
Bioensaio	Tratamento	Longevidade média (horas)
Bioensaio 1: Contato de <i>A. mellifera</i> com superfície vítrea pulverizada com fungos entomopatogênicos	Testemunha	90,43 $\pm$ 5,79 a
	<i>B. bassiana</i>	95,04 $\pm$ 5,52 a
	<i>M. anisopliae</i>	73,35 $\pm$ 4,66 b
$p$		< 0,05
Bioensaio 2: Contato de <i>A. mellifera</i> com folhas de eucalipto tratadas com fungos entomopatogênicos	Testemunha	157,44 $\pm$ 7,79 a
	<i>B. bassiana</i>	151,29 $\pm$ 7,35 a
	<i>M. anisopliae</i>	117,74 $\pm$ 6,34 b
$p$		< 0,05
Bioensaio 3: Pulverização de fungos entomopatogênicos sobre <i>A. melífera</i>	Testemunha	177,4 $\pm$ 5,65 a
	<i>B. bassiana</i>	159,36 $\pm$ 5,66 b
	<i>M. anisopliae</i>	139,86 $\pm$ 5,89 c
$p$		< 0,05
Bioensaio 4: Fungos entomopatogênicos incorporados à pasta Cândi	Testemunha	183,6 $\pm$ 5,03 a
	<i>B. bassiana</i>	172,56 $\pm$ 6,05 a
	<i>M. anisopliae</i>	126,9 $\pm$ 6,16 b
$p$		< 0,05

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

Em contato com superfície vítrea pulverizada com os tratamentos é possível verificar que as operárias de *A. mellifera* provenientes da testemunha e de *B. bassiana* apresentaram maior sobrevivência (aproximadamente 170 e 190 horas, respectivamente), quando comparadas às operárias provenientes do tratamento com *M. anisopliae* (120 horas, aproximadamente) (Figura 7).

**Figura 7** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato de operárias de *Apis mellifera* com superfície vítrea pulverizada com os tratamentos.

Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

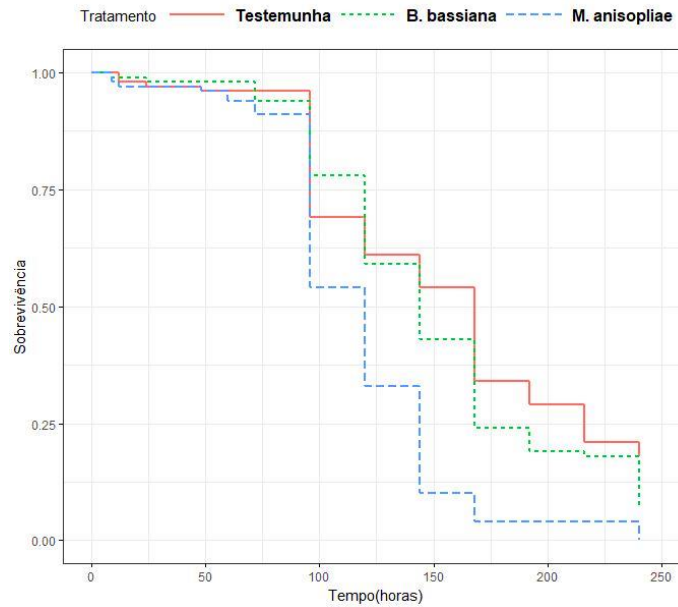


Fonte: Autoria própria, 2018.

As operárias tiveram redução em sua sobrevivência após o contato com as folhas tratadas com *M. anisopliae*, quando comparadas às operárias provenientes dos tratamentos testemunha e *B. bassiana* (Figura 8). Verificou-se que, em 150 horas de experimento, haviam apenas 10 operárias vivas no tratamento com *M. anisopliae*, enquanto nos tratamentos testemunha e *B. bassiana* ainda haviam, aproximadamente, 60 e 40 operárias em cada.



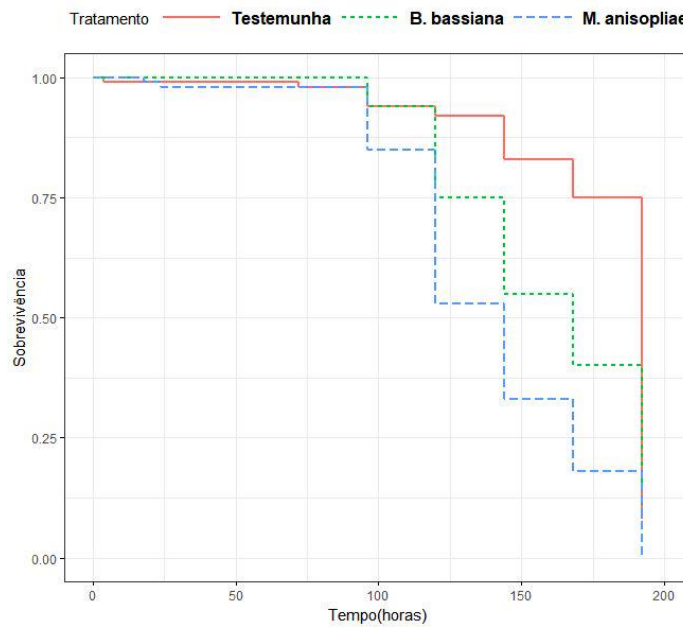
**Figura 8** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato de operárias de *Apis mellifera* com folhas de eucalipto tratadas com os tratamentos. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Observou-se que 150 horas após a pulverização dos tratamentos sobre *A. mellifera*, ainda haviam, aproximadamente, 85 operárias vivas no tratamento testemunha, 55 operárias no tratamento *B. bassiana* e 30 no tratamento *M. anisopliae* (Figura 9).

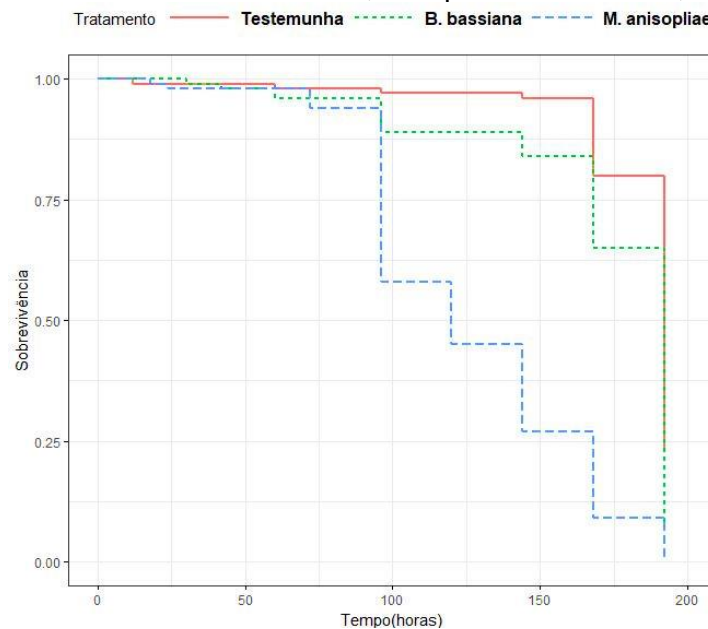
**Figura 9** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após pulverização dos tratamentos sobre *Apis mellifera*. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Em 175 horas após ingestão de pasta cândi incorporada com os tratamentos, praticamente todas as operárias provenientes do tratamento *M. anisopliae* já estavam mortas, enquanto que nos tratamentos testemunha e *B. bassiana* ainda haviam abelhas vivas (aproximadamente 80 e 65 abelhas, respectivamente) (Figura 10).

**Figura 10** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após ingestão de pasta Cândi incorporada com os tratamentos. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.



Fonte: Autoria própria, 2018.

#### Fungos entomopatogênicos na morfometria de rainhas de *A. mellifera*

Nos ciclos de produção de rainhas, quando testados os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foram produzidas 42 e 41 rainhas no ciclo 1 (testemunha e *B. bassiana*, respectivamente) e 49 e 41 rainhas no ciclo 2 (testemunha e *M. anisopliae*, respectivamente) (Quadro 1). Verificou-se que os fungos entomopatogênicos não interferiram na morfometria e no tempo de emergência das rainhas provenientes do tratamento, quando comparadas às rainhas provenientes de suas respectivas testemunhas (Tabela 2).

**Quadro 1** - Quantidade de realeiras e aceitação de larvas nos ciclos de produção de rainhas de *A. mellifera*. Temperatura de  $34 \pm 2$  °C e U. R. de  $60 \pm 10\%$ . UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

<b>Tratamento</b>	<b>Quantidade de realeiras</b>	<b>Aceitação de larvas</b>
Testemunha (Água destilada esterilizada)	168	42
<i>B. bassiana</i>	168	41
Testemunha (Água destilada esterilizada)	168	49
<i>M. anisopliae</i>	168	41

**Tabela 2** - Médias das variáveis analisadas após emergência de rainhas de *A. mellifera* produzidas sob ingestão de geleia real incorporada com *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Temperatura de  $34 \pm 2$  °C e U. R. de  $60 \pm 10\%$ . UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

<b>Tratamento</b> Variável	<b>Testemunha*</b>	<b><i>B. bassiana</i>*</b>	<b>p</b>
Peso (mg)	224,12 ± 4,68	221,89 ± 4,24	0,6153
Ctotal (mm)	17,51 ± 1,09	17,45 ± 1,18	0,8277
Cabd (mm)	11,05 ± 0,90	10,95 ± 0,86	0,5832
Labd (mm)	4,74 ± 0,68	4,67 ± 0,58	0,4500
Lasa (mm)	3,28 ± 0,45	3,33 ± 0,48	0,3256
Casa (mm)	10,05 ± 0,72	9,99 ± 0,71	0,6075
Ctórax (mm)	4,61 ± 0,73	4,70 ± 0,60	0,3866
Ltórax (mm)	4,44 ± 0,62	4,49 ± 0,61	0,5367
Atórax (mm)	4,79 ± 0,58	4,76 ± 0,54	0,6381
Tempo de emergência (min)	2651 ± 27,40	2818 ± 27,22	0,3087

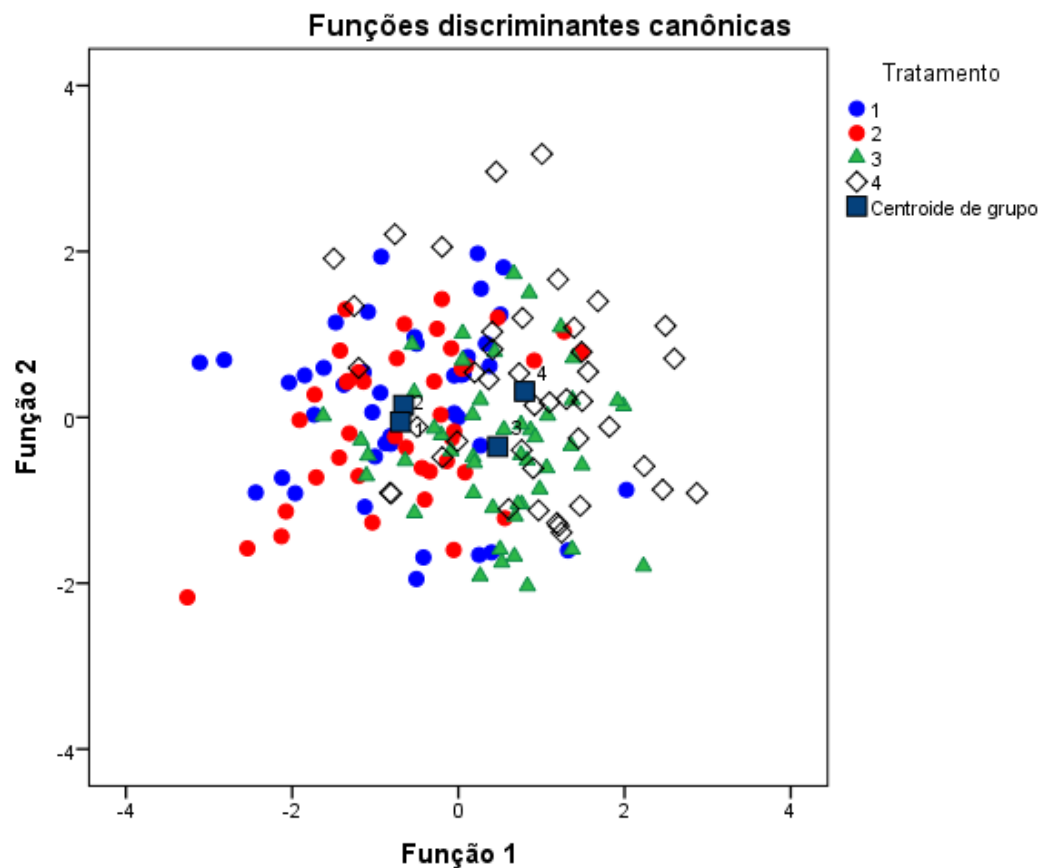
  

<b>Tratamento</b> Variável	<b>Testemunha*</b>	<b><i>M. anisopliae</i>*</b>	<b>p</b>
Peso médio (mg)	211,93 ± 4,62	213,47 ± 4,87	0,7488
Ctotal (mm)	17,09 ± 0,98	17,19 ± 1,35	0,7662
Cabd (mm)	10,66 ± 0,78	10,97 ± 0,95	0,0697
Labd (mm)	4,65 ± 0,52	4,60 ± 0,58	0,4304
Lasa (mm)	3,44 ± 0,46	3,46 ± 0,51	0,7135
Casa (mm)	10,42 ± 0,70	10,52 ± 0,76	0,3594
Ctórax (mm)	4,59 ± 0,50	4,58 ± 0,55	0,9930
Ltórax (mm)	4,57 ± 0,47	4,56 ± 0,54	0,9099
Atórax (mm)	4,65 ± 0,39	4,66 ± 0,51	0,9900
Tempo de emergência (min)	2598 ± 28,29	2451 ± 32,30	0,4593

\*As médias dos tratamentos nas linhas não diferem entre si, pelo teste T de student. Ctotal: comprimento total; Cabd: comprimento do abdome; Labd: largura do abdome, Lasa: largura da asa; Casa: comprimento da asa; Ctórax: comprimento do tórax; Ltórax: largura do tórax; Atórax: altura do tórax.

É possível verificar que os centroides (médias) dos tratamentos 1 (Testemunha) e 2 (*B. bassiana*), localizados a esquerda do gráfico, são semelhantes pois estão próximos entre si, demonstrando que as rainhas que ingeriram geleia real incorporada com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* não apresentaram deformação ou redução nos parâmetros avaliados, quando comparadas às respectivas testemunhas (Figura 11). Já os centroides (médias) dos tratamentos 3 (Testemunha) e 4 (*M. anisopliae*), localizados a direita do gráfico, estão mais afastados entre os tratamentos 1 e 2, porém estão próximos entre si, verificando que *M. anisopliae* também não causou alteração na morfometria das rainhas que ingeriram geleia real incorporada com o entomopatógeno.

**Figura 11** - Ordenação bidimensional dos tratamentos e suas respectivas rainhas. Tratamentos: 1) Testemunha 1; 2) *B. bassiana*; 3) Testemunha 2; 4) *M. anisopliae*



Fonte: Autoria própria, 2018.

## DISCUSSÃO

O sucesso na adesão, penetração e infecção dos fungos entomopatogênicos no corpo dos insetos e a morte destes necessita passar por quatro etapas: a) adesão, através de mucilagem e proteínas adesivas, e germinação dos esporos; b) formação de tubos germinativos e apressórios para penetração na cutícula do inseto; c) multiplicação das hifas no corpo do inseto e absorção dos nutrientes do hospedeiro, o levando a morte e d) crescimento das hifas externamente ao corpo do inseto e formação de novos esporos (DING; CHI, 2018; QU; WANG, 2018). O fungo entomopatogênico *B. bassiana* é conhecido por ser seletivo no processo de adesão, pois os conídios penetram apenas em pontos de infecção apropriados (ALVES, 1998; DING; CHI, 2018), além disso, a composição da cutícula do inseto pode interferir no processo de adesão (VALERO-JIMÉNEZ et al., 2016).

O fato do fungo *B. bassiana* ter causado redução na longevidade das abelhas no bioensaio de pulverização direta, pode estar relacionado ao seu modo de ação, neste caso, os conídios do fungo poderiam estar presentes em maior concentração e assim, ter penetrado o exoesqueleto das operárias através das membranas intersegmentais do abdome, que é a porta de entrada mais comum para fungos, ocorrendo a colonização e levando as abelhas a morte (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018). Nos demais bioensaios, provavelmente *B. bassiana* não causou redução da longevidade, devido à dificuldade dos conídios de *B. bassiana* penetrarem via segmentos tarsais, bem como nas peças bucais. Mesmo quando ingeridos, os conídios de *B. bassiana* podem não causar infecção, isto pode ocorrer pois alguns insetos possuem estruturas no tubo digestivo capazes de filtrar determinados fungos (Alves, 1998).

Lord; Howard, (2004) verificaram que a composição da cutícula de *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae) reduziu a adesão de *B. bassiana*, o que também pode ter ocorrido nos bioensaios de contato com superfície vítrea, contato com folhas de eucalipto e ingestão de pasta cãndi incorporada com solução de *B. bassiana* no presente trabalho. Porém, quando pulverizado diretamente sobre as abelhas, este fungo causou redução na longevidade de *A. mellifera*.

A pulverização é o método ideal para o controle de insetos-praga à campo, porém, apenas as abelhas forrageiras entram em contato com tais agentes os levando para a colônia, onde as outras operárias irão entrar em contato apenas com os resíduos e não com a quantidade que foi aplicada à campo. Assim, o processo de infecção pode ser impedido pela resposta imune das abelhas e até mesmo pelo comportamento higiênico, onde estas irão realizar a limpeza dos resíduos do fungo (QU; WANG, 2018). Em relação ao sistema imune, a cutícula das abelhas é a primeira barreira efetiva para impedir que ocorra a penetração e infecção por patógenos, porém, quando ainda assim há a penetração, estas possuem mecanismos de defesa imunológica, tanto celular, que é mediada pelos hemócitos e circulam na hemolinfa, como humoral, que depende de sinalização específica, como a entrada do patógeno (QU; WANG, 2018), para evitar a infecção causada por entomopatógenos, como os fungos.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho também foram verificados por Alves et al. (1996) e Potrich et al. (2018), quando testaram o fungo entomopatogênico *B. bassiana* isolado 447 e isolado PL 63, respectivamente, porém utilizando diferentes métodos de aplicação em laboratório, os quais causaram redução na longevidade e provocaram mortalidade das operárias de *A. mellifera* africanizadas. Do mesmo modo, Al mazra'awi (2007) ao testar *B. bassiana*, isolados GHA, London BB001 e Arkansas ARSEF 3769 e Portilla et al. (2017) ao avaliar o isolado NI8 sobre operárias de *A. mellifera carnica* e *A. mellifera* europeia, respectivamente, verificaram que os isolados causaram mortalidade das operárias em laboratório.

A seletividade de dois isolados de *B. bassiana* (GHA e TPB3) também foi testada, em laboratório, à operárias forrageiras de *A. mellifera* europeias e verificou-se que ambos diminuíram a sobrevivência das abelhas (JAMES; MCGUIRE; LELAND, 2012). Quando inoculado diretamente na área de cria, *B. bassiana* (isolado GHA) diminuiu a emergência de abelhas adultas e reduziu o peso das operárias de *A. mellifera* europeias emergidas (HAMIDUZZAMAN et al., 2012). Assemelhando-se aos resultados encontrados no trabalho, onde *B. bassiana*, quando pulverizado diretamente, reduziu a longevidade das abelhas.

Entretanto, quatro isolados de *B. bassiana* (EABb 04/01-Tip, EABb 01/110-Su, Bb-1333 e EABb 01/103-Su) quando pulverizados diretamente sobre operárias de *A.*



*mellifera* europeias, não provocaram mortalidade e apenas um desses isolados (EABb 01/110-Su) causou infecção nas pupas (GARCÍA-FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008). Diferindo dos resultados encontrados no presente trabalho, onde foi observado efeito negativo de *B. bassiana* na longevidade e sobrevivência de *A. mellifera* africanizada no bioensaio de pulverização direta. Sendo assim, verifica-se que diferentes isolados de *B. bassiana* e diferentes métodos de aplicação podem causar efeitos distintos em *A. mellifera*, demonstrando a necessidade de sempre avaliar o impacto de entomopatógenos a esses polinizadores.

Já o fungo *M. anisopliae* utilizado no presente trabalho causou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* em todos os testados em laboratório. Os resultados podem estar relacionados a facilidade de penetração dos conídios de *M. anisopliae* em qualquer parte do corpo das operárias, até mesmo via segmentos tarsais e peças bucais, devido a produção de mucilagem e de proteínas adesivas, como MAD1 e MAD2, as quais auxiliam a fixação do fungo no corpo do hospedeiro, além de contribuírem na patogenicidade (WANG; LEGER, 2007). Também deve-se enfatizar que operárias mais jovens, como as utilizadas nos bioensaios, possuem hábito de higiene mais ativo, *selfgrooming* e *grooming* (BRIGHENTI et al., 2007; LECLERCQ et al., 2018; QU; WANG, 2018).

O hábito de higiene, ao mesmo tempo em que permite a retirada dos conídios do corpo do inseto, também pode causar uma dispersão entre as abelhas ou mesmo a movimentação do conídio para algum local ou fenda de difícil remoção. Isto ocorre, pois ao tentarem realizar a limpeza do entomopatógeno do corpo das abelhas presentes na mesma gaiola, que já estão contaminadas, através do *grooming*, as operárias podem dispersar e facilitar a penetração dos conídios de *M. anisopliae* (BRIGHENTI et al., 2007).

Por serem insetos sociais, na presença de substância desconhecidas e sob condições laboratoriais, acabam utilizando o comportamento higiênico como prevenção à substâncias possivelmente nocivas, condição que pode ter ocorrido nos bioensaios testados, facilitando a infecção por *M. anisopliae*. Deve-se também ressaltar que em laboratório as operárias foram submetidas à condições extremas, as quais favoreciam o desenvolvimento dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, como temperatura de  $27 \pm 2$  °C, pois é a temperatura considerada ideal para a germinação destes (23 a 30 °C), (AL

MAZRA'AWI, 2007; ALVES et al., 1996), bem como o estresse comum do manuseio em laboratório, podendo torná-las mais vulneráveis aos patógenos.

Potrich et al. (2018) verificaram que o fungo *M. anisopliae* (isolado E9) causou redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizadas, quando pulverizado diretamente sobre as operárias, quando em contato em placas de petri e quando incorporado em pasta cãndi, resultado semelhante ao observado no trabalho, onde *M. anisopliae* isolado IBCB 425 também ocasionou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* nos quatro bioensaios realizados. Do mesmo, Hamiduzzaman et al., (2012) também verificaram que este mesmo fungo (isolado UAMH9198), quando testado à campo inoculado diretamente nas crias, afetou o desenvolvimento destas, reduzindo o peso corporal de *A. mellifera* europeia, porém não afetou a emergência das abelhas adultas.

Todavia, quando avaliados diferentes isolados de *M. anisopliae*, o fungo não interferiu no desenvolvimento da colônia de *A. mellifera* europeia, bem como no número de abelhas por colônia, número de crias, quantidade de pólen e mel, além de não causar infecção nas larvas, pré-pupas, pupas e em abelhas adultas (AHMED; ABD-ELHAY, 2013; GARCÍA-FERNÁNDEZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ; QUESADA-MORAGA, 2008; KANGA et al., 2010; KANGA; JONES; GRACIA, 2006; KANGA; JONES; JAMES, 2003). Diferindo dos resultados encontrados no presente trabalho, onde *M. anisopliae* causou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* africanizadas nos quatro bioensaios realizados.

Assim, verifica-se que os diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos podem ser seletivos ou não aos organismos, bem como a espécie testada. Ressalta-se assim a importância de sempre testar novos isolados e produtos presentes no mercado, principalmente sobre os diferentes polinizadores, pois o efeito dos fungos entomopatogênicos encontrados no presente trabalho podem diferir de acordo com o isolado e o organismo em que forem testados, não sendo uma prospecção verdadeira para outras espécies de abelhas.

Além disso, os fungos entomopatogênicos também são capazes de produzir toxinas com atividade inseticida, que irão afetar seus hospedeiros. Dentre as toxinas, *B. bassiana* produz beauvericina, que possui atividade inseticida e citotóxica aos insetos

(ALVES, 1998; MALLEBRERA; PROSPERINI, 2018). Quando ocorre a produção de beauvericina por *B. bassiana*, estas são capazes de formar aberturas na membrana celular dos insetos, impedindo que ocorra a troca e o transporte de substâncias, além disso, essas toxinas causam degeneração progressiva do tecido do hospedeiro (VALENCIA et al., 2011). Entretanto, a beauvericina só será produzida quando ocorrer a penetração e infecção de *B. bassiana* no corpo do inseto.

As destruxinas, conhecidas por serem neurotóxicas, são produzidas por *M. anisopliae* após o contato com os conídios, penetração e infecção do fungo no corpo do hospedeiro (ALVES, 1998; AMIRI; IBRAHIM; BUTT, 2010; SAMUELS; REYNOLDS; CHARNLEY, 1988). Determinadas destruxinas causam despolarização da membrana, devido a abertura dos canais de cálcio, com isso ocorre a contração irregular das células musculares e paralisia do inseto (SAMUELS; REYNOLDS; CHARNLEY, 1988). Então o inseto reduz ou cessa suas atividades e, no caso das abelhas, estas não conseguem praticar seu hábito de higiene, o *selfgrooming*, facilitando a infecção por *M. anisopliae* (SAMUELS; REYNOLDS; CHARNLEY, 1988). Além disso, as destruxinas podem causar efeitos citotóxicos e imunodepressores nos insetos, fatores que podem ter facilitado a penetração de *M. anisopliae* nas operárias dos bioensaios, causando redução da longevidade (LIU; TZENG, 2012; PEDRAS; ZAHARIA; WARD, 2002; SAMUELS; REYNOLDS; CHARNLEY, 1988).

Em colônias saudáveis, as abelhas possuem a capacidade de eliminar abelhas contaminadas com patógenos. Segundo Qu, Wang (2018), a eliminação do patógeno pode ocorrer dentro de cada abelha, através de seu sistema imune natural (QU; WANG, 2018). Porém, quando as operárias são expostas a estressores, como inseticidas e patógenos, elas podem se tornar incapazes de combater esse agente, pois enfraquecem seu sistema imune, facilitando assim a infecção por patógenos ou por toxinas produzidas por estes (HAMIDUZZAMAN et al., 2012; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2016). Após o processo de infecção pelos fungos entomopatogênicos, estes secretam substâncias a fim de evitar a resposta imune do hospedeiro. Além disso, *M. anisopliae* é conhecido por expressar a proteína MCL1, que tem a função de impedir que os hemócitos reconheçam as hifas do fungo (QU; WANG, 2018). Fatores que podem ter ocorrido nos bioensaios do presente trabalho, causando redução nas operárias de *A. mellifera*.

Apesar de *B. bassiana* causar redução da longevidade das operárias após pulverização direta e *M. anisopliae* afetar negativamente a longevidade das abelhas nos quatro bioensaios em laboratório, o efeito é mínimo quando comparado aos efeitos causados pelos inseticidas químicos sintéticos (BAPTISTA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009; CATAE et al., 2017; LIBARDONI, 2017; THANY et al., 2015). Ainda assim, é necessário verificar a influência de fungos entomopatogênicos à campo, na produção e morfometria de rainhas, para que esses possam ser utilizados de maneira segura, sem afetar negativamente estes parâmetros.

A morfometria de rainhas de *A. mellifera* pode ser considerado como fator preponderante na qualidade das rainhas e na produção de mel. O peso e o tamanho da rainha merecem destaque, pois quanto maior e mais pesada for uma rainha, maior o número de ovariolos e o tamanho da espermateca e também maior será a produção de mel (AKYOL et al., 2008; BIENEFELD; REINHARDT; TIERHALTUNG, 2007; OLDROYD; GOODMAN, 1990; VANENGELSDORP; OTIS, 2000; WOYKE, 1971). Porém não há na literatura estudos avaliando a influência de agentes de controle, como os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, na produção de rainhas e na morfometria destas.

No entanto, estudos foram realizados a fim de produzir rainhas de maior qualidade à campo, que irão expressar essa qualidade em maior produção de mel. Para tal, foram produzidas rainhas e avaliados os parâmetros morfométricos, bem como o peso à emergência destas, os quais o peso das rainhas variou entre 160,0 e 225,0 mg (AKYOL et al., 2008; DE SOUZA et al., 2013, 2015; UCHÔA et al., 2012), valor que se assemelha ao peso das rainhas produzidas com ingestão de geleia real incorporada com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

A ingestão de geleia real incorporada com *B. bassiana* e *M. anisopliae* não acometeu os parâmetros morfométricos das rainhas produzidas. O comprimento do abdome de rainhas virgens pode variar entre 9,4 a 11 mm (FAQUINELLO et al., 2011; METORIMA et al., 2015) e a largura geralmente apresenta média de 4,6 mm (FAQUINELLO et al., 2011). Já os valores para a largura e comprimento da asa variam entre 3,2 a 3,7 mm e 9,6 e 9,9 mm, respectivamente (METORIMA et al., 2015; TARPY; HATCH; FLETCHER, 2000). Em relação as mensurações do tórax, o comprimento médio

é de 4,68 mm (TARPY; HATCH; FLETCHER, 2000), a largura apresenta valores entre 4,60 a 4,76 mm e a altura valor médio de 4,80 mm (METORIMA et al., 2015; TARPY; HATCH; FLETCHER, 2000).

O tempo de desenvolvimento de rainhas de *A. mellifera* em condições normais ou para produção destas, desde a presença de ovos de um dia até a emergência varia de 12,5 a 18 dias (FELL; MORSE, 1984; TOFILSKI; CZEKONSKA, 2004). Para as rainhas produzidas no presente trabalho, o tempo de desenvolvimento para *B. bassiana* foi de 14,95 dias e para *M. anisopliae* foi de 14,70 dias, valores que se encontram dentro do intervalo de tempo descrito acima.

Este estudo demonstra que os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são seguros durante a produção de rainhas de *A. mellifera* africanizada à campo. Então, no caso de uma operária contaminada com o entomopatógeno alimentar a larva que será a futura rainha, ou caso ocorra a contaminação dentro da colônia, esta não acarretará em deformações ou em redução na morfometria da rainha. Entretanto, novos estudos tanto em laboratório, quanto à campo, testando diferentes isolados e concentrações de entomopatógenos, bem como diferentes métodos de aplicação devem ser realizados, para garantir que os outros entomopatógenos sejam são seguros à *A. mellifera* africanizada.

## CONCLUSÃO

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* afetou negativamente a sobrevivência e a longevidade das operárias no bioensaio de pulverização direta, enquanto *M. anisopliae* interferiu negativamente na longevidade e sobrevivência das abelhas em todos os bioensaios de laboratório. Apesar disso, *B. bassiana* e *M. anisopliae* não interferiram na produção de rainhas de *A. mellifera* africanizada, bem como nos parâmetros morfométricos e no tempo de emergência destas.

## 4 CAPÍTULO II – TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia uniflora* E *Pogostemon cablin* A OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA

### INTRODUÇÃO

A procura por métodos sustentáveis para o manejo de pragas vem aumentando devido as exigências do mercado consumidor, aos problemas ambientais causados pelos inseticidas químicos sintéticos nos agroecossistemas, além de efeitos adversos do uso abusivo destes, como baixa seletividade aos organismos não-alvo (BASS et al., 2015; SPARKS; NAUEN, 2015; TOMASETTO et al., 2017). Como estratégia mais sustentável para o controle de insetos-praga, têm-se o controle alternativo com a utilização de óleos essenciais (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008).

Os óleos essenciais (OE) possuem ampla diversidade de princípios químicos presentes em seu metabolismo secundário, tais como terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros, que apresentam potencial repelente, inseticida e acaricida (CAMILO et al., 2017; DAMIANI; GENDE; BAILAC, 2009; GASHOUT; GUZMÁN-NOVOA, 2009; ISMAN, 2000, 2006; PAVELA; BENELLI, 2016). Além disso, também apresentam vantagens quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos, como rápida degradação, baixa toxicidade aos mamíferos, seletividade aos insetos-praga e baixa fitotoxicidade (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008; MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; PAVELA; BENELLI, 2016). Os efeitos da utilização desse método de controle são: toxicidade à patógenos; pausa na alimentação dos insetos; interferência no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, na diapausa e no comportamento dos insetos; ação repelente e inseticida; além de afetar o sistema nervoso central (AGUIAR-MENEZES, 2005; CHEGINI et al., 2018; CHEGINI; ABBASIPOUR, 2017; COSME; CARVALHO; MOURA, 2007; ISMAN, 2000; MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009; VIZZOTTO, 2010).

O óleo essencial de pitanga, *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) foi avaliado para o controle de diferentes insetos-praga, demonstrando seu potencial inseticida e repelente (COITINHO et al., 2010; JUNG et al., 2013; STENGER, 2017), bem como o óleo essencial de patchouli, *Pogostemon cablin* (Lamiaceae), o qual se mostrou tóxico no controle de

insetos (ALBUQUERQUE et al., 2013; DALLACORT, 2017; GOKULAKRISHNAN et al., 2013; PAVELA, 2005, 2008; ROCHA et al., 2018; ZHU et al., 2003).

Porém, por possuírem potencial inseticida e acaricida, os óleos essenciais podem ser nocivos à organismos não-alvo, como as abelhas *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), as quais estão sofrendo com a Desordem do Colapso das Colônias (DCC). A DCC se caracteriza pela rápida perda de abelhas adultas, excesso de crias em relação ao número de adultos da colônia e pouca ou nenhuma abelha morta dentro ou fora da colônia (VANENGELSDORP et al., 2009, 2017; VANENGELSDORP; UNDERWOOD; HAYES, 2007). As causas para o acontecimento desse fenômeno ainda não são conclusivas, mas o uso incorreto e excessivo de produtos químicos para o controle de pragas é tido como principal fator que acarreta a DCC (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010; JOHNSON et al., 2010; PILATIC, 2012; STAVELEY et al., 2014; VANENGELSDORP et al., 2017).

Por serem utilizados como alternativa para a redução do uso de inseticidas químicos sintéticos, estudos já foram realizados a fim de verificar a toxicidade de alguns óleos essenciais a *A. mellifera*. Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), além dos componentes do metabolismo secundário de alguns óleos essenciais, como timol, mentol e o ácido oxálico causam toxicidade às operárias (BONNAFÉ et al., 2015; DAMIANI; GENDE; BAILAC, 2009; ELLIS; BAXENDALE, 1997; ROMO-CHACÓN et al., 2016). Entretanto, produtos comerciais à base dos óleos vegetais de *Ricinus communis* (mamona), *Azadirachta indica* (neem) e de *Glycine max* (soja) não afetaram a longevidade das operárias de *A. mellifera* (SILVA et al., 2007).

Devido ao potencial dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* para o controle de insetos-praga e com a descoberta de novos compostos inseticidas, são necessários estudos a fim de verificar o efeito destes sobre organismos não-alvo e de importância econômica e ambiental, como as abelhas *A. mellifera*. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* na longevidade de operárias de *A. mellifera* africanizada em laboratório, por meio de quatro metodologias e realizar a cromatografia gasosa dos óleos essenciais, a fim de verificar os principais compostos do metabolismo secundário destes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos óleos essenciais e das operárias de *A. mellifera*

Os óleos essenciais utilizados nos bioensaios foram *Eugenia uniflora* - pitanga (Myrtaceae) e *Pogostemon cablin* - patchouli (Lamiaceae), cedidos por empresa parceira e utilizados na concentração de 0,75% (750 µL do óleo /100 mL de água destilada esterilizada), concentração avaliada por Stenger (2017) e Dallacort (2017), apresentando efeito inseticida sobre *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae). Além disso, foi realizada análise cromatográfica dos óleos essenciais utilizados. Para isto, as análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná, utilizando injeção automática (TripPlus As, Thermo) em um cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas de íon trap (Polaris Q, Thermo). As amostras dos OE foram injetadas com divisão de fluxo (Split) 1:50 (1µL) e separadas através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x0,025mm, Agilent). A separação dos compostos foi feita com temperatura do injetor á 230 °C, linha de transferência 250 °C, com fluxo constante e compensação a vácuo. A programação de temperatura do forno foi: 40 °C, isoterma de 6 min, aquecimento até 300 °C na taxa de 3 °C.min<sup>-1</sup>, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo de ionização por impacto de elétrons á 70 eV, com temperatura da fonte de íons em 200 °C.

Os favos contendo crias operculadas de operárias de *A. mellifera* africanizada de 19 dias foram obtidos de colônias provenientes do apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) - Apicultura da UTFPR-DV. Os favos foram retirados do apiário, acondicionados em sacos de papel Kraft (60 x70 cm com gramatura 50 mm), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico I e então alocados em câmara climatizada (30 ± 2°C, U.R de 60± 10%), até sua emergência, obtendo-se operárias de idade padronizada (Figura 1).



**Figura 1** - A) Favo do tipo langstroth contendo as crias operculadas de *A. mellifera* para realização dos bioensaios; B) Favos acondicionados em câmara climatizada ( $30 \pm 2$  °C e U.R de  $60 \pm 10\%$ ).



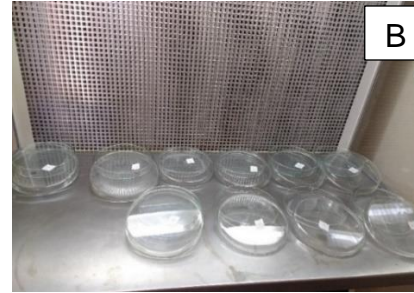
Fonte: Autoria própria, 2018.

Bioensaio 1: Toxicidade dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin*, por contato em superfície vítrea, à operárias de *A. mellifera* africanizada

Os tratamentos utilizados foram: Água destilada esterilizada, óleo essencial de *E. uniflora* e óleo essencial de *P. cablin*, ambos na concentração de 0,75%. Para o contato das operárias com os tratamentos em superfície vítrea, foram pulverizados 290  $\mu$ L dos tratamentos (volume baseado na área da placa na qual a solução foi pulverizada em relação ao volume de calda por hectare) em placas de Petri de vidro (15 cm  $\varnothing$  x 1,5 cm de altura).

Para a pulverização, utilizou-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Tecnal<sup>®</sup> (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm). As placas foram montadas de forma que houvesse fluxo de ar e acondicionadas em câmara de fluxo laminar horizontal para a evaporação completa da água (metodologia adaptada de Carvalho et al., 2009) (Figura 2A, B).

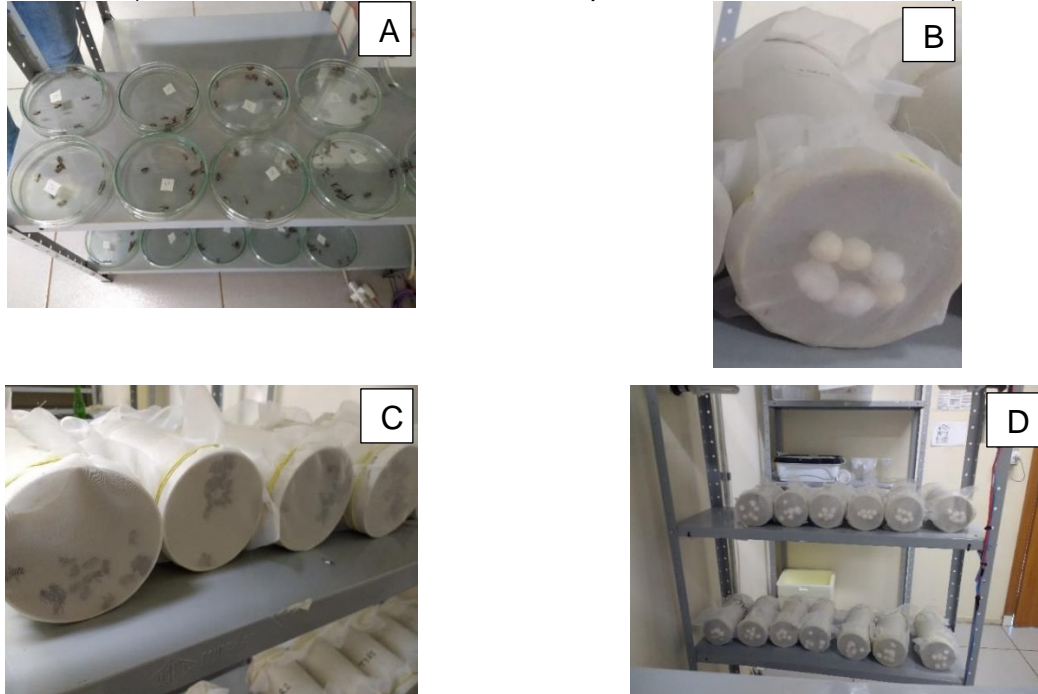
**Figura 2** - A) Bomba de pressão utilizada para pulverização das soluções dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin*; B) Placas de petri dispostas em câmara de fluxo laminar horizontal para evaporação da água.



Fonte: Autoria própria, 2018.

Posteriormente, dez operárias de *A. mellifera*, anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por 120 segundos, foram inseridas no interior dessas placas, durante duas horas, sendo duas placas consideradas uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento. Na sequência as abelhas foram transferidas, em grupos de 20 indivíduos, para gaiolas de PVC (20 cm de altura × cm de Ø), cobertos com *voile*, cada gaiola foi considerada uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento. Sobre o *voile* foi adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (açúcar de confeitaria e mel) (metodologia adaptada de Brighenti et al., 2007) (Figura 3A, 3B e 3C).

**Figura 3** - A) Operárias de *A. mellifera* em contato com superfície vítrea pulverizada com as soluções dos óleos essenciais; B) Gaiola de PVC contendo pasta cândi e algodão embebido em água destilada esterilizada; C) Operárias de *A. mellifera* acondicionadas em gaiolas de PVC após contato com óleo essencial de *E. uniflora* e *P. cablin* e D) Gaiolas de PVC dispostas em sala climatizada ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E).



Fonte: Autoria própria, 2018.

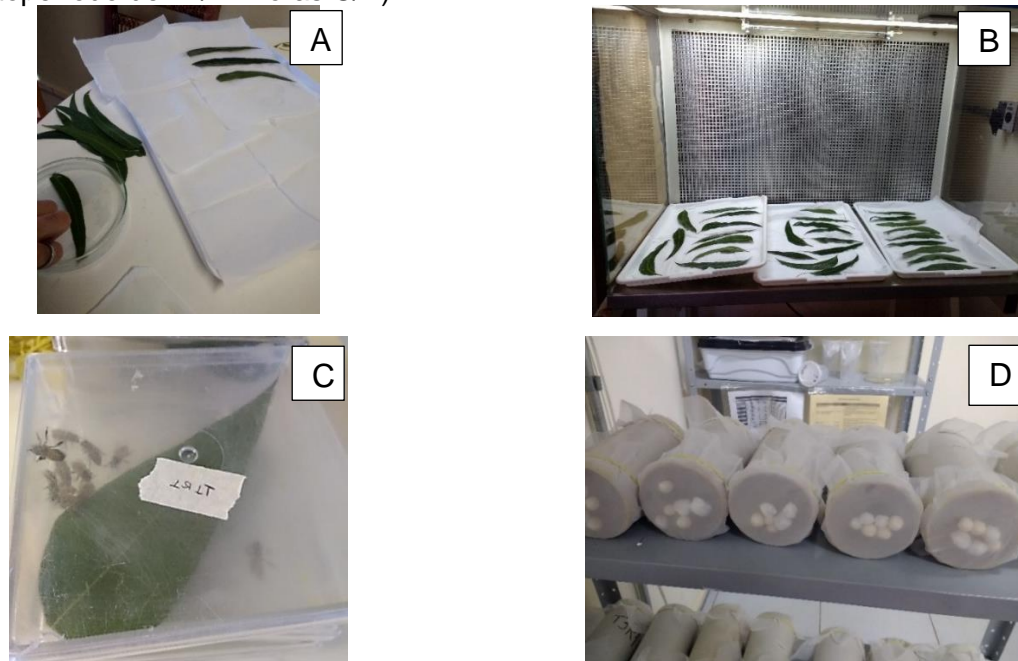
As gaiolas contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12/12 horas C/E). A mortalidade das operárias foi avaliada a partir de uma, duas, três, quatro, cinco, seis, nove, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 até 240 horas após a pulverização dos tratamentos, realizando a contagem dos insetos mortos (metodologia adaptada de Baptista et al., 2009) (Figura 3D).

Bioensaio 2: Toxicidade dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin*, por contato em folhas de eucalipto, à operárias de *A. mellifera* africanizada

Folhas de *Eucalyptus dunnii* sem tratamento fitossanitário prévio foram coletadas, higienizadas e imersas por cinco segundos nos tratamentos, em seguida, foram alocadas em câmara de fluxo unidirecional laminar horizontal (VECO) para evaporação completa da água (Figura 4A e 4B). Após a evaporação, as folhas foram

dispostas, individualmente, em caixas gerbox (11×11×3,5 cm) e então as operárias de *A. mellifera* anestesiadas com CO<sub>2</sub> por 120 segundos foram inseridas nas caixas, durante duas horas (Figura 4C e 4D). A distribuição das repetições e tratamentos, bem como as condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos anteriormente.

**Figura 4** - A) Imersão das folhas de *E. dunnii* nas soluções de *E. uniflora* e *P. cablin*; B) Folhas de eucalipto dispostas em câmara de fluxo laminar horizontal para secagem; C) Contato das operárias de *A. mellifera* com as folhas de eucalipto tratadas com os óleos essenciais e D) Gaiolas de PVC contendo as operárias alocaadas em sala climatizada (27 ± 2 °C, U.R. de 60 ± 10% e fotoperíodo de 12/12 horas C/E).



Fonte: Autoria própria, 2018.

**Bioensaio 3: Toxicidade dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* pulverizados diretamente sobre operárias de *A. mellifera* africanizada**

Dez operárias de *A. mellifera* foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por 120 segundos transferidas para placas de Petri (15 cm Ø×1,5 cm de altura) esterilizadas. Na sequência, pulverizou-se 290 µL do tratamento, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Tecnal<sup>®</sup> (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm<sup>2</sup>), o volume foi calculado com base na área da placa na qual a solução foi pulverizada, levando-se

em conta a recomendação de volume por hectare. O mesmo procedimento foi realizado para todos os tratamentos/repetições. A distribuição das repetições e tratamentos, bem como as condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no bioensaio 1.

Bioensaio 4: Toxicidade dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin*, incorporados à pasta Cândi, a *A. mellifera*

Vinte operárias recém emergidas de *A. mellifera* foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, por 120 segundos, e alocadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura × cm de Ø), sendo posteriormente cobertos com *voile* e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água. Como alimento foi fornecido às operárias pasta Cândi acrescida dos tratamentos. A pasta Cândi deste bioensaio foi preparada, individualmente, para cada tratamento. Foi realizada uma mistura de 50 g de açúcar de confeito, 10 mL de mel puro e 75 µL de cada óleo (*E. uniflora* e *P. cablin*). Como testemunha utilizou-se pasta Cândi pura (sem adição dos tratamentos). A distribuição das repetições e tratamentos, bem como as condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no bioensaio 1.

#### Análise estatística

Os dados dos bioensaios 1, 2 e 3 foram submetidos à análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e as médias comparadas entre si pelo teste de Dun, à nível de 95% de credibilidade, após foi realizada análise de sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier, através do software estatístico R<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

Após o contato com superfície vítrea pulverizada com os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin*, a longevidade das abelhas não foi reduzida (94,17 e 97,47 horas, respectivamente), quando comparado à testemunha (90,43 horas) (Tabela 1). A sobrevivência das operárias provenientes desses tratamentos foi semelhante, conforme observado na Figura 7. Em 100 horas de experimento haviam aproximadamente 30 operárias vivas no tratamento testemunha, 50 operárias no tratamento OE de *E. uniflora* e 40 no tratamento OE de *P. cablin*.

Entretanto, quando os óleos essenciais estavam em folhas de eucalipto, o óleo essencial de *P. cablin* causou redução na longevidade das operárias de *A. mellifera* (95,23 horas) (Tabela 1). As operárias do tratamento com OE de *P. cablin* tiveram redução em sua sobrevivência, quando comparadas às operárias provenientes dos tratamentos testemunha e OE de *E. uniflora*. Em 150 horas de experimento praticamente todas as operárias do tratamento com OE de *P. cablin* estavam mortas, enquanto, aproximadamente, 50 e 70 abelhas estavam vivas nos tratamentos testemunha e OE de *E. uniflora*, respectivamente (Figura 8).

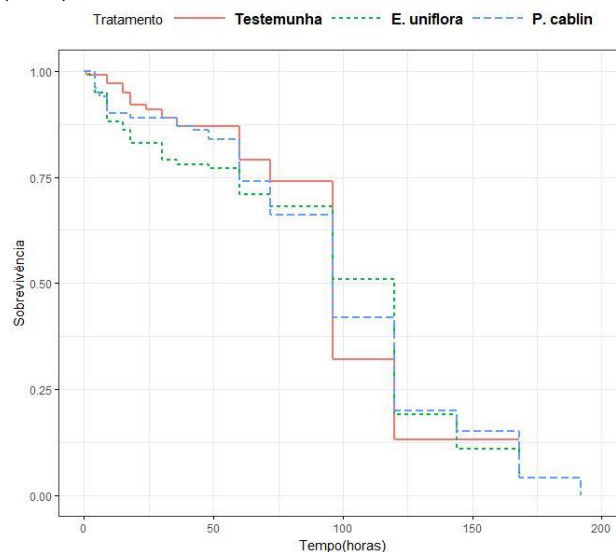
Quando pulverizados diretamente sobre *A. mellifera* e quando incorporados à pasta cãndi, os óleos essenciais de *E. uniflora* (164,16 e 141,9 horas, respectivamente) e de *P. cablin* (143,88 e 142,32 horas, respectivamente) reduziram a longevidade das operárias, quando comparados às testemunhas (177,4 e 183,6 horas, respectivamente) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Longevidade média (em horas)  $\pm$  EP de operárias de *A. mellifera* africanizada após serem submetidas a quatro bioensaios com *E. uniflora* e *P. cablin*. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

Bioensaio	Tratamento	Longevidade média (horas)
Toxicidade dos OE, por contato em superfície vítrea, a operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada	Testemunha	90,43 $\pm$ 5,79 a
	OE de <i>E. uniflora</i>	94,17 $\pm$ 7,11 a
	OE de <i>P. cablin</i>	97,47 $\pm$ 6,99 a
$p$		> 0,05
Toxicidade dos OE, por contato em folhas de eucalipto, a operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada	Testemunha	157,44 $\pm$ 7,79 a
	OE de <i>E. uniflora</i>	173,38 $\pm$ 7,83 a
	OE de <i>P. cablin</i>	95,23 $\pm$ 8,04 b
$p$		< 0,05
Toxicidade dos OE pulverizados diretamente sobre operárias de <i>A. mellifera</i>	Testemunha	177,4 $\pm$ 5,65 a
	OE de <i>E. uniflora</i>	164,16 $\pm$ 5,76 b
	OE de <i>P. cablin</i>	143,88 $\pm$ 6,41 c
$p$		< 0,05
Toxicidade dos OE incorporados à pasta cândi a <i>A. mellifera</i>	Testemunha	183,6 $\pm$ 5,03 a
	OE de <i>E. uniflora</i>	141,9 $\pm$ 6,38 b
	OE de <i>P. cablin</i>	142,32 $\pm$ 6,50 b
$p$		< 0,05

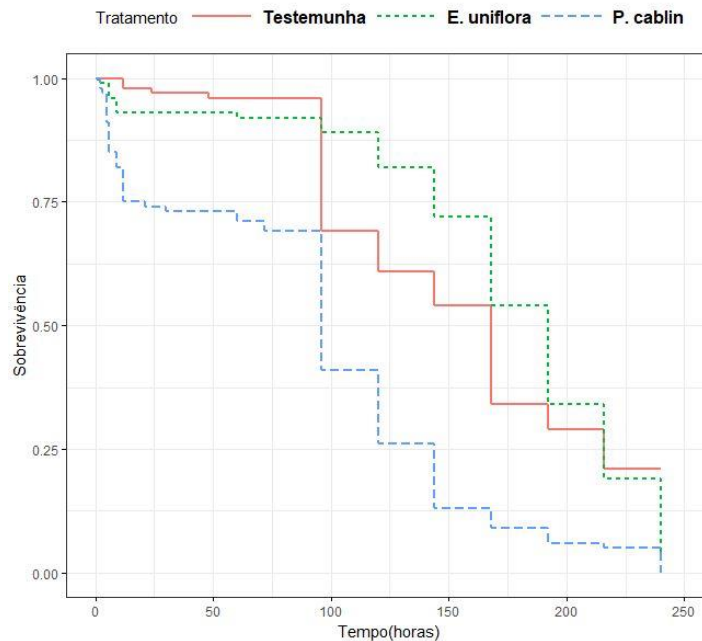
Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Dun em nível de 95% de credibilidade. EP: Erro Padrão. OE: óleos essenciais

Figura 7 - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato de operárias de *Apis mellifera* com superfície vítrea pulverizada com os tratamentos. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.



Fonte: Autoria própria, 2018.

**Figura 8** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após contato de operárias de *Apis mellifera* com folhas de eucalipto tratadas com os tratamentos. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

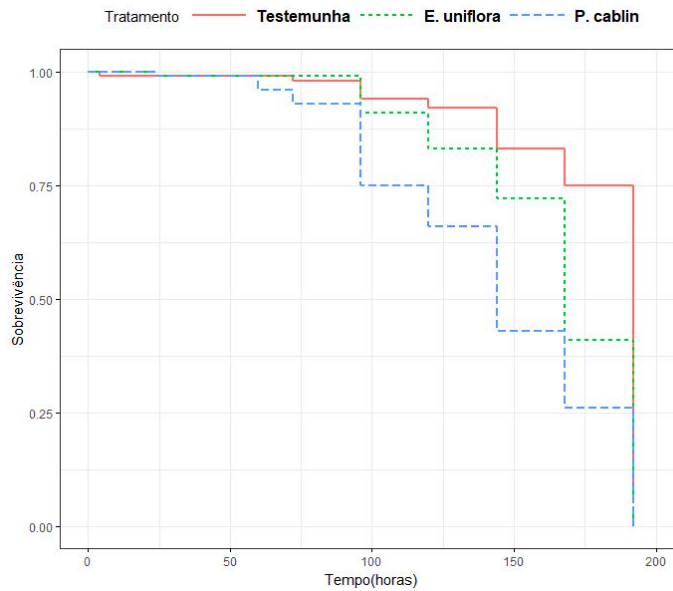


Fonte: Autoria própria, 2018.

Após a pulverização dos tratamentos diretamente sobre *A. mellifera*, é possível verificar que as operárias provenientes dos tratamentos com OE de *E. uniflora* e OE de *P. cablin* tiveram redução em sua sobrevivência, quando comparadas às operárias do tratamento testemunha. A maior redução de sobrevivência foi observada nas abelhas que foram pulverizadas com o OE de *P. cablin*, pois em 196 horas de experimento haviam, aproximadamente, 25 operárias vivas, enquanto no tratamento testemunha haviam aproximadamente 75 operárias e 40 no tratamento com OE de *E. uniflora* (Figura 9). Quando os óleos foram incorporados à pasta cândi verificou-se que em 150 horas de experimento apenas 40 operárias estavam vivas no tratamento com OE de *E. uniflora* e 50 operárias no tratamento com OE de *P. cablin*, enquanto que no tratamento testemunha praticamente todas as abelhas ainda estavam vivas (Figura 10).

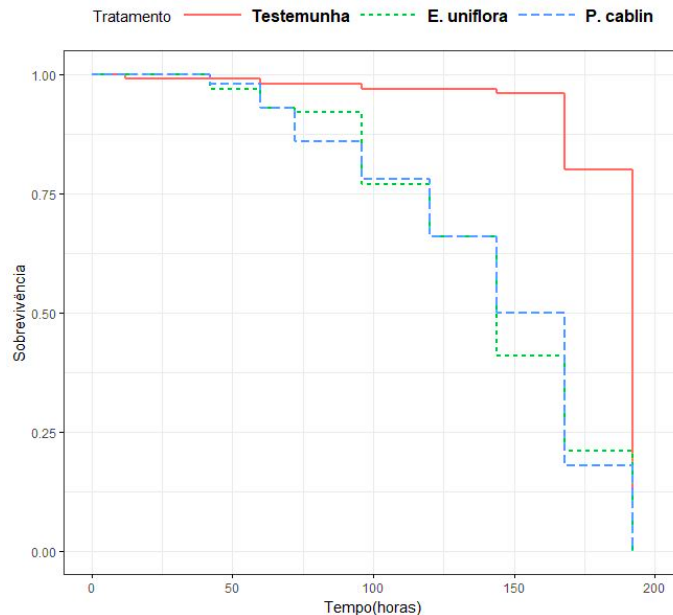


**Figura 9** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após pulverização dos tratamentos sobre *Apis mellifera*. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.



Fonte: Autoria própria, 2018.

**Figura 10** - Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ajustada aos tempos (horas), após ingestão de pasta Cândi incorporada com os tratamentos. Temperatura de  $27 \pm 2$  °C, U. R. de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12/12 horas C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2018.

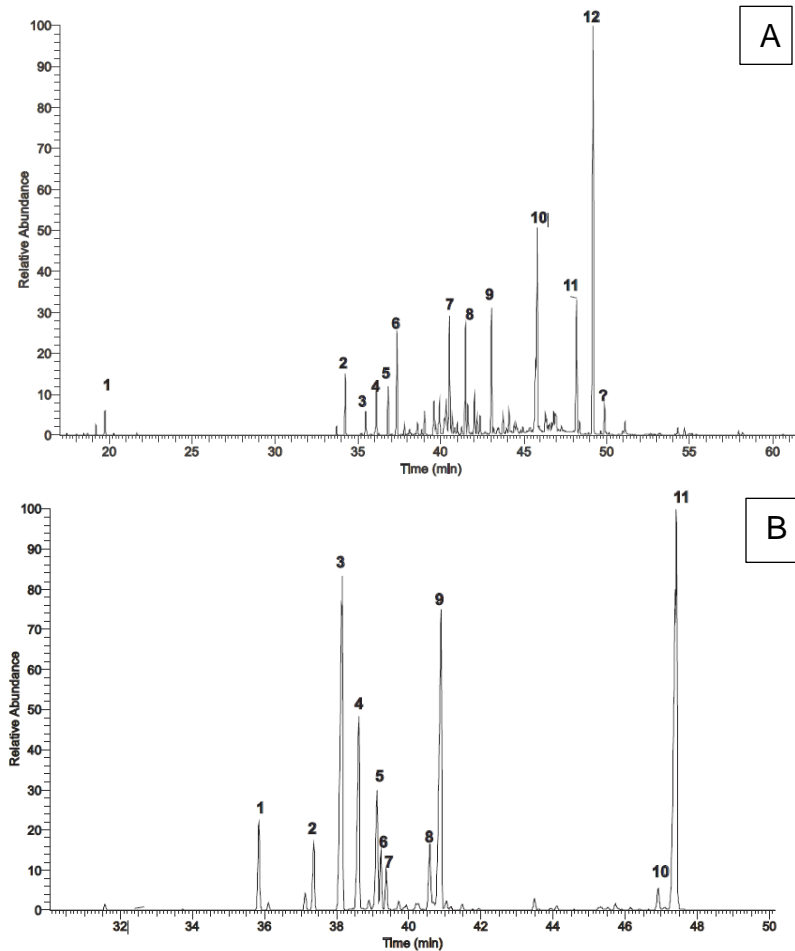


Fonte: Autoria própria, 2018.

Na cromatografia gasosa do óleo essencial de *E. uniflora* foram identificados 12 compostos e, dentre eles, em maior quantidade foram identificados calamen-10-ona

(20,21%), silfiperferol-6-em-5-ona (10,06%), germacrona (6,61%), germacreno B (6,24%). Já na cromatografia gasosa do óleo essencial de *P. cablin* foram identificados 12 compostos e patchoulol (21,99%),  $\alpha$ -guaiano (18,32%) e  $\gamma$ -patchouleno (16,44%) foram os compostos encontrados em maior quantidade (Figura 11).

**Figura 11** - Gráfico dos componentes identificados por cromatografia gasosa do OE. A: OE de *E. uniflora* - 1) *E*- $\beta$ -Cimeno; 2)  $\alpha$ -Cubeno; 3)  $\alpha$ -Ciclosativeno; 4)  $\beta$ -Elemeno; 5)  $\alpha$ -Gurjuneno; 6) *E*-Carofileno; 7) Curzereno; 8)  $\delta$ -Amorfeno; 9) A-Germacreno B; 10) Silfiperferol-6-em-5-ona; 11) Germacrona; 12) Calamen-10-ona; B: OE de *P. cablin* - 1)  $\beta$ -Patchouleno; 2)  $\beta$ -Carofileno; 3)  $\alpha$ -Guaiano; 4) Seicheleno; 5)  $\alpha$ -Patchouleno; 6) allo-Alomadreno; 7) ?; 8) cis- $\beta$ -Guaiano; 9)  $\gamma$ -Patchouleno; 10) Pogostol; 11) Patchoulol.



## DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são compostos lipofílicos e conhecidos por serem citotóxicos, sendo assim, atravessam a membrana citoplasmática e rompem as estruturas presentes nas células dos insetos, além de provocarem despolarização das membranas mitocondriais, afetando os canais iônicos (BAKKALI; IDAOMAR, 2008). Porém, esse não é um efeito desejado em organismos não-alvos, como as abelhas *A. mellifera*.

Além disso, podem alterar a fluidez das membranas, o que resulta em estresse oxidativo pelo vazamento de íons, proteínas e radicais livres, podem permeabilizar as membranas mitocondriais, causando a morte por apoptose e necrose (BAKKALI; IDAOMAR, 2008; CARVALHO et al., 2017; CUNHA et al., 2015; RATTAN, 2010). Os óleos essenciais também agem no sistema nervoso dos insetos inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase, gerando acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, assim o inseto entra em estado de estimulação permanente, falta de coordenação no sistema neuromuscular e conseqüentemente, a morte (DAMBOLENA et al., 2016).

Possivelmente a redução na longevidade das operárias nos bioensaios realizados seja devido ao modo de ação dos óleos essenciais, além disso, a redução da sobrevivência das abelhas oriundas do bioensaio de ingestão de pasta cãndi incorporada com os óleos essenciais pode estar relacionada ao efeito repelente que esses causam (ALBUQUERQUE et al., 2013; ROCHA et al., 2018), fazendo com que as abelhas não tenham ingerido de fato o alimento. Alguns estudos foram realizados a fim de verificar o efeito de diferentes óleos essenciais a *A. mellifera* e à outros insetos da ordem Hymenoptera, mesma ordem de *A. mellifera*.

O óleo essencial de *Origanum majorana* (manjerona - Lamiaceae) apresenta efeito tóxico sobre operárias de *A. mellifera* europeias (GASHOUT; GUZMÁN-NOVOA, 2009), assemelhando-se com os resultados encontrados no presente trabalho, no qual o óleo essencial de *P. cablin*, também pertencente à família Lamiaceae, causou efeito tóxico à *A. mellifera*, diminuindo a longevidade das abelhas em três bioensaios. Da mesma forma, os óleos essenciais de *Carapa guianensis* (andiroba - Meliaceae), *Cymbopogon winterianus* (capim-citronela - Poaceae), *Eucalyptus* sp. (eucalipto -

Myrtaceae) e o óleo de *Azadirachta indica* (neem - Meliaceae) demonstraram toxicidade à larvas e operárias de *A. mellifera* africanizada (EFROM et al., 2012; XAVIER et al., 2015). Resultados semelhantes foram verificados no trabalho, onde *E. uniflora* e *P. cablin* foram tóxicos, causando redução da longevidade de *A. mellifera*.

Do mesmo modo, quando o óleo de neem foi testado à campo, este causou redução na área de cria e ocasionou a perda da rainha de *A. mellifera* (MELATHOPOULOS et al., 2000). Ao contrário do verificado em outros trabalhos, Ebert et al. (2007) e Sabahi et al. (2017) verificaram que os óleos essenciais de *O. majorana* (manjerona - Lamiaceae) e *Origanum vulgare* (orégano - Lamiaceae) não foram prejudiciais e não causaram a mortalidade de *A. mellifera* europeia.

Ademais, trabalhos foram realizados a fim de verificar o efeito do óleo essencial de *E. uniflora* sobre o parasitoide de ovos *Cleurochoides noackae* Lin & Huber, inimigo natural e inseto também pertencente à ordem Hymenoptera. Este óleo causou toxicidade, provocando redução ou ausência de ovos parasitados, além de reduzindo a porcentagem de emergência dos parasitoides (STENGER, 2017). Apesar dos parâmetros avaliados serem diferentes, os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* também foram tóxicos a operárias de *A. mellifera*, causando redução na sobrevivência das abelhas.

Por possuírem potencial repelente e inseticida, os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* foram testados no controle de formigas, insetos também pertencentes à ordem Hymenoptera. O óleo essencial de *E. uniflora* causou mortalidade das formigas cortadeiras *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em quatro concentrações testadas (JUNG et al., 2013). Da mesma forma, o óleo essencial de *P. cablin* demonstrou potencial repelente e tóxico à três espécies de formigas urbanas *Camponotus melanoticus* Emery, *Camponotus novograndensis* e *Dorymyrmex thoracicus* Gallardo (Hymenoptera: Formicidae) (ALBUQUERQUE et al., 2013). Esse mesmo óleo também causou efeito repelente para três espécies de formigas cortadeiras, *Atta sexdens* L., *Atta opaciceps* Borgmeier e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), reduzindo a velocidade de deslocamento destas, causando efeitos prejudiciais em seu comportamento (ROCHA et al., 2018). Assim como verificado nos trabalhos anteriores, no presente trabalho, os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* também foram tóxicos

aos insetos da ordem Hymenoptera (operárias de *A. mellifera* africanizada), diminuindo a longevidade destas.

Diferentes trabalhos verificaram a presença de compostos e quantidades distintos na composição química de *E. uniflora* e *P. cablin* (ALBUQUERQUE et al., 2013; BRUN; MOSSI, 2010; GOKULAKRISHNAN et al., 2013; MELO et al., 2007; OGUNWANDE et al., 2005; SANTOS; BRAZ-FILHO; CASTRO, 2015; ZHU et al., 2003). A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com fatores genéticos da planta e fatores ambientais, como radiação, temperatura, quantidade de nutrientes, altitude, sazonalidade e disponibilidade de água, bem como a idade e o desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), o que pode explicar a divergência da composição dos óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* deste trabalho, quando comparada à outros trabalhos.

Independente da caracterização dos óleos essenciais, *E. uniflora* e *P. cablin* apresentaram efeito negativo à *A. mellifera*, causando redução na longevidade das operárias, não sendo o efeito desejado para organismos não-alvo. Os compostos majoritários tanto de *E. uniflora* quanto de *P. cablin* são terpenos, mono e sesquiterpenos, compostos já conhecidos por serem tóxicos, ocasionando alterações fisiológicas e comportamentais em insetos (DAMBOLENA et al., 2016; MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; RATTAN, 2010), o que pôde ter acarretado em toxicidade às abelhas.

Estudos avaliando a toxicidade de inseticidas químicos sintéticos sobre *A. mellifera* africanizadas (após o contato, pulverização e ingestão de pasta cãndi contaminada), foram conduzidos por Baptista et al. (2009), Carvalho et al. (2009) e Libardoni (2017), os quais constataram que estes produtos reduziram a sobrevivência das abelhas para, no máximo, 40 horas apenas ou até mesmo causaram mortalidade duas horas depois de submetidas aos tratamentos. Embora os óleos essenciais de *E. uniflora* e *P. cablin* tenham causado toxicidade às operárias de *A. mellifera*, reduzindo a longevidade destas em dois e três bioensaios, respectivamente, dos quatro bioensaios realizados no presente trabalho, essa redução é consideravelmente inferior à redução causada pelos inseticidas químicos sintéticos (BAPTISTA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009; LIBARDONI, 2017), reafirmando que os resultados do presente trabalho, apesar

de diferirem de suas respectivas testemunhas são menos danosos do que quando há a utilização do controle de insetos-praga convencional.

Porém, ainda assim, sugere-se a realização de testes à campo, a fim de verificar o efeito de *E. uniflora* e *P. cablin* à *A. mellifera*. Além disso, testes com a utilização de diferentes óleos essenciais e outros métodos de aplicação são necessários, para que, então, o controle alternativo configure-se como um novo ramo de aplicação no controle de insetos-praga, de forma sustentável, além de garantir a seguridade aos organismos não-alvo, com as abelhas *A. mellifera* africanizada.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *E. uniflora* foi tóxico à *A. mellifera* quando pulverizado diretamente sobre as operárias e quando estas ingeriram pasta cãndi incorporada com a solução do óleo essencial. Já o óleo essencial de *P. cablin* causou redução na sobrevivência das operárias nos bioensaios de toxicidade por contato em folhas de eucalipto, pulverização direta e quando incorporado à pasta cãndi.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias realizadas para avaliar o efeito de agentes de controle a *A. mellifera* simulam o contato que pode ocorrer à campo no momento do forrageamento, porém quando aplicados em campo outros fatores podem interferir no modo de ação dos agentes, como temperatura, umidade e até mesmo a quantidade em que as abelhas irão se contaminar, assim os efeitos causados nas abelhas podem ser amenizados. Além disso, o momento de aplicação dos produtos utilizados para o controle de insetos-praga é fator preponderante na sobrevivência de *A. mellifera*, então se aplicados fora do período de florescimento das plantas que serão visitadas pelas abelhas ou até mesmo em horários em que não há forrageamento, como no início da manhã ou no final da tarde, provavelmente as abelhas não irão se contaminar com os agentes de controle ou essa contaminação será reduzida.

Ainda assim, a influência dos fungos entomopatogênicos e dos óleos essenciais na sobrevivência das operárias de *A. mellifera* é mínima quando comparada aos inseticidas químicos sintéticos, então a utilização destes pode ser uma alternativa no controle de insetos-praga, visando maior longevidade das abelhas. Porém, sugere-se a realização de novos bioensaios, além de experimentos à campo, testando diferentes métodos de aplicação, linhagens, concentrações, diferentes entomopatógenos e óleos essenciais, além de testes sobre as diferentes castas de *A. mellifera*, para atestar a segurança dos mesmos sobre *A. mellifera* africanizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-MENEZES, E. DE L. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. [s.l.] Seropédica, 2005.
- AHMED, A. A.; ABD-ELHAY, H. K. Efficacy of two fungus-base biopesticide against the honeybee ectoparasitic mite, varroa destructor. **Pakistan journal of biological sciences**, v. 16, n. 16, p. 819–825, 2013.
- AKYOL, E. et al. Live Weight of Queen Honey Bees (*Apis Mellifera* L.) Predicts Reproductive Characteristics. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 81, n. 2, p. 92–100, 2008.
- AL MAZRA'AWI, M. Impact of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* on the Honey Bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, p. 7–11, 2007.
- AL MAZRA'AWI, M. S. et al. Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. **Environmental Entomology**, v. 35, n. 6, p. 1569–1577, 2006.
- ALBUQUERQUE, E. L. D. et al. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 181–186, 2013.
- ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113–122, 2009.
- ALVES, S. B. et al. Effects of some insect pathogens on the Africanized honey bee, *Apis mellifera* L. (Hym., Apidae). **Journal applied of entomology**, v. 120, p. 559–564, 1996.
- AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e abelhas. **Revista de ciências Agrárias**, v. 5, p. 53–62, 2012.
- AMIRI, B.; IBRAHIM, L.; BUTT, T. M. Antifeedant Properties of *Destruxins* and their Potential Use with the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* for Improved Control of Crucifer Pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 487–498, 2010.
- AMIRI, E. et al. Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health : Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health. **Insects**, v. 8, n. 48, p. 1–18, 2017.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 458–479, 2014.
- BAKKALI, F.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALE, J. S.; LENTEREN, J. C. VAN; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 363, p. 761–776, 2007.
- 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.
- BASS, C. et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 1–10, 2015.
- BIENEFELD, K.; REINHARDT, F.; TIERHALTUNG, V. I. Genetic evaluation in the honey



- bee considering queen and worker effects – A BLUP-Animal Model approach \*. **Apidologie**, v. 38, p. 77–85, 2007.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.
- BONNAFÉ, E. et al. Effect of a thymol application on olfactory memory and gene expression levels in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8022–8030, 2015.
- BRIGHENTI, D. M. et al. BIOATIVIDADE do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 279–289, 2007.
- BRUN, G. R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p. 135–142, 2010.
- CALDERONE, N. W. Insect Pollinated Crops , Insect Pollinators and US Agriculture : Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992 – 2009. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 24–28, 2012.
- CALVETE, E. O. et al. POLINIZAÇÃO DE MORANGUEIRO POR *Apis mellifera*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 181–188, 2010.
- CAMILO, C. J. et al. Acaricidal activity of essential oils. **Trends in Phytochemical Research**, v. 1, n. 4, p. 183–198, 2017.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture : Future perspectives. **Ecological Indicators**, v. in press, p. 1–13, 2018.
- CARVALHO, N. R. DE. et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil promotes mitochondrial dysfunction in *Drosophila melanogaster* through the inhibition of oxidative phosphorylation. **Toxicology Research**, p. 1–28, 2017.
- CARVALHO, S. M. et al. Toxicidade De Acaricidas / Inseticidas Empregados Na Citricultura Para a Abelha Africanizada *Apis Mellifera* L ., 1758 (Hymenoptera : Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 76, n. 4, p. 597–606, 2009.
- CATAE, A. F. et al. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera*. **Ecotoxicology**, p. 1–13, 2017.
- CATAE, A. F. et al. MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. **Pest Management Science**, p. 1–8, 2018.
- CHAIMANEE, V. et al. 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.
- CHEGINI, S. G. et al. Toxicity of Shirazi thyme, *Zataria multiflora* essential oil to the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 4, p. 340–347, 2018.
- CHEGINI, S. G.; ABBASIPOUR, H. Chemical composition and insecticidal effects of the essential oil of cardamom, *Elettaria cardamomum* on the tomato leaf miner , *Tuta absoluta*. **Toxin Reviews**, v. 36, n. 1, p. 12–17, 2017.
- 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.
- COITINHO, R. L. B. DE C. et al. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7,

p. 1492–1496, 2010.

COSME, L. V.; CARVALHO, G. A.; MOURA, A. P. Efeitos de inseticidas botânico e sintéticos sobre ovos e larvas de *Cycloneda sanguinea* ( Linnaeus ) ( Coleoptera : Coccinellidae ) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 251–258, 2007.

COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D. A.; TOLEDO, V. DE A. A. Sistemas de Produção Agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Florestais) – Ano 2010. In: **Sistemas de Produção Agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Florestais)**. [s.l.: s.n.]. v. 1989p. 45–67.

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

CUNHA, F. A. B. DA. et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, p. 634–644, 2015.

DALLACORT, S. **Avaliação de óleos essenciais sobre *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle Biológico De Pragas No Brasil Por Meio De *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill 37. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 37–41, 2009.

DAMBOLENA, J. S. et al. Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health — A Structure-Activity Relationship Study. **Pshyche**, p. 1–17, 2016.

DAMIANI, N.; GENDE, L. B.; BAILAC, P. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* ( Acari : Varroidae ) and *Apis mellifera* ( Hymenoptera : Apidae ). **Parasitology Research**, v. 106, p. 145–152, 2009.

DE SOUZA, D. A. et al. Experimental evaluation of the reproductive quality of Africanized queen bees (*Apis mellifera*) on the basis of body weight at emergence. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5382–5391, 2013.

DE SOUZA, D. A. et al. Morphometric identification of queens, workers, intermediates in in vitro reared honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

DESTÉFANO, R. H. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; MESSIAS, C. L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 245–252, 2004.

DING, J.; CHI, D.-F. Ultrastructural observations of *Beauveria bassiana* infection in *Xylotrechus rusticus* larvae. **Entomological Research**, v. 48, p. 204–213, 2018.

EBERT, T. A. et al. Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 46, n. 4, p. 220–224, 2007.

EFROM, C. F. S. et al. Side-Effects of Pesticides Used in the Organic System of Production on *Apis mellifera* Linnaeus , 1758. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 47–53, 2012.

ELLIS, M. D.; BAXENDALE, A. P. Toxicity of Seven Monoterpenoids to Tracheal Mites (Acari: Tarsonemidae) and Their Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hosts When Applied as Fumigants. **Apiculture and Social Insects**, v. 90, n. 5, p. 1087–1091, 1997.

ERTHAL JUNIOR, M. **Controle biológico de insetos pragas**. I Seminário Mosaico Ambiental. **Anais...**2011

- FAQUINELLO, P. et al. Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees. **Sociobiology**, v. 57, n. 3, p. 495–510, 2011.
- FAROOQUI, T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder : A unique hypothesis. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 1, p. 122–136, 2013.
- FELL, R. D.; MORSE, R. A. Emergency queen cell production in the honey bee colony. **Insectes Sociaux**, v. 31, n. 3, p. 221–237, 1984.
- FREITAS B. M., PINHEIRO, J. N. Polinizadores e Pesticidas:Princípios de Manejo para os Agroecossistemas Brasileiro. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, p. 1–116, 2012.
- FREITAS, B. M.; SILVA, C. I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. In: **Agricultura e Polinizadores**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 71.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Pathogenicity and thermal biology of mitosporic fungi as potential microbial control agents of Varroa destructor ( Acari : Mesostigmata ), an ectoparasitic mite of honey bee , Apis mellifera ( Hymenoptera : Apidae )\* Pedro G arc ´. **Apidologie**, v. 39, p. 662–673, 2008.
- GARIBALDI, L. A. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Science**, p. 1–7, 2013.
- GASHOUT, H. A.; GUZMÁN-NOVOA, E. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, Varroa destructor , and to larval and adult worker honey bees (Apis mellifera L.). **Journal of Apicultural Research**, v. 48, n. 4, p. 263–269, 2009.
- GAZZONI, D. L. **Soja E Abelhas**. Brasília: Embrapa, 2017.
- GIANNINI, T. C. et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 209–223, 2015.
- GILLEY, D. C.; TARPY, D. R.; LAND, B. B. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee ( Apis mellifera L .) colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 55, p. 190–196, 2003.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOKULAKRISHNAN, J. et al. Pupicidal and repellent activities of Pogostemon cablin essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. 26–31, 2013.
- 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 da Biologia**, v. 9, n. 3, p. 53–57, 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, n. 2, p. 200–207, 2011.
- GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 1 SPEC.ISSUE, p. 186–188, 2010.
- HAMIDUZZAMAN, M. M. 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, n. 3, p. 237–243, 2012.

- HATJINA, F. et al. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, p. 2013, 2013.
- HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 2012.
- HOWARD, P. H.; ALLEN, P. Beyond Organic and Fair Trade? An Analysis of Ecolabel Preferences in the United States. **Rural Sociology**, v. 75, n. 2, p. 244–269, 2010.
- HUNG, K. J. et al. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of The Royal Society B**, p. 1–8, 2018.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012a.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. O desaparecimento das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização. **Documentos (Embrapa Semi-Árido. Online)**, v. 249, p. 210–233, 2012b.
- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603–608, 2000.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45–66, 2006.
- ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides ? **Pest Management Science**, v. 71, p. 1587–1590, 2015.
- JAMES, R. R.; MCGUIRE, M. R.; LELAND, J. E. Susceptibility of Adult Alfalfa Leafcutting Bees 1 and Honey Bees 2 to a Microbial Control Agent, *Beauveria bassiana*. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 13–21, 2012.
- JOHNSON, B. R. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 5, p. 777–784, 2008.
- JOHNSON, R. M. et al. Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312–331, 2010.
- JUNG, P. H. et al. Atividade inseticida de eugenia uniflora L. e melia azedarach L. sobre *atta laevigata* smith. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 2, p. 191–196, 2013.
- KANGA, L. H. B. et al. Development of a user-friendly delivery method for the fungus *Metarhizium anisopliae* to control the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Experimental and Applied Acarology**, v. 52, n. 4, p. 327–342, 2010.
- KANGA, L. H. B.; JONES, W. A.; GRACIA, C. Efficacy of strips coated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies in Texas and Florida. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 3–4, p. 249–258, 2006.
- KANGA, L. H. B.; JONES, W. A.; JAMES, R. R. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of economic entomology**, v. 96, n. 4, p. 1091–9, 2003.
- KEELING, C. I. et al. New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. **PNAS**, v. 100, n. 8, p. 4486–4491, 2003.
- KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**, v. 4, n. 1, p. 63–84, 2008.
- KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near

- agricultural fields. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 412–431, 2012.
- KURWADKAR, S.; EVANS, A. Neonicotinoids: Systemic Insecticides and Systematic Failure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 6, p. 745–748, 2016.
- LIBARDONI, G. **Efeito de *Bacillus thuringiensis* e produtos fitossanitários sintéticos na longevidade de operárias *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
- LIU, B.; TZENG, Y. Development and applications of destruxins : A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1242–1254, 2012.
- LORD, J. C.; HOWARD, R. W. A Proposed Role for the Cuticular Fatty Amides of *Liposcelis bostrychophila* ( Psocoptera : Liposcelidae ) in Preventing Adhesion of Entomopathogenic Fungi with Dry-conidia. **Mycopathologia**, v. 158, p. 211–217, 2004.
- LORENCETTI, G. A. T. et al. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 403–411, 2018.
- MALLEBRERA, B.; PROSPERINI, A. In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity : A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 537–545, 2018.
- MARANGONI, C.; MOURA, N. F. DE; GARCIA, F. R. M. Utilização De Óleos Essenciais E Extratos De Plantas No Controle De Insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95–112, 2012.
- MEIKLE, W. G. et al. Duration and spread of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), used to treat varroa mites (Acari: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 1, p. 1–10, 2007.
- MEIKLE, W. G. et al. Impact of a treatment of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on honeybee ( *Apis mellifera* ) colony health and on *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). **Apidologie**, v. 39, n. 2, p. 247–259, 2008.
- MELATHOPOULOS, A. P. et al. Field Evaluation of Neem and Canola Oil for the Selective Control of the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mite Parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari : Tarsonemidae ). **Apiculture and Social Insects**, v. 93, n. 3, p. 559–567, 2000.
- 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.
- MELO, R. M. et al. Identification of impact aroma Compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 179–183, 2007.
- MESSING, R.; BRODEUR, J. Current challenges to the implementation of classical biological control. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2018.
- METORIMA, F. N. et al. Morphometric measurements of Africanized honeybee queens kept in an incubator or in queen banking. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, n. 1, p. 91–96, 2015.
- MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. **Bee Culture**, v. 128, n. March 2000, 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.

- OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, 2005.
- OLDROYD, B. P.; GOODMAN, R. D. On the relative importance of queens and workers to honey production. **Apidologie**, v. 21, p. 153–159, 1990.
- OLIVEIRA, J. E. M. DE; NICODEMO, D.; OLIVEIRA, F. F. DE. Contribuição da polinização entomófila para a produção de frutos de aceroleira. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 1, p. 56–65, 2015.
- OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2012.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321–326, 2011.
- PARRA, J. Biological control in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, n. October, p. 345–355, 2014.
- PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7–8, p. 691–696, 2005.
- PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 274–278, 2008.
- PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1000–1007, 2016.
- PEDRAS, M. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, p. 579–596, 2002.
- PILATIC, H. **Pesticides and Honey Bees: State of the Science**. [s.l.: s.n.].
- PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.
- PORTILLA, M. et al. Lethality of the Entomogenous Fungus *Beauveria bassiana* Strain NI8 on *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and its Possible Impact on Beneficial Arthropods. **Journal of Entomological Science**, v. 52, n. 4, p. 352–369, 2017.
- POTRICH, M. et al. Effect of entomopathogens on Africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p. 5–12, 2018.
- POTTS, S. ET AL. **Status and trends of european pollinators - Key findings from the STEP project**. [s.l.: s.n.].
- POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.
- QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 83, p. 96–103, 2018.
- 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. 6, n. 10, p. 1–21, 2007.
- RANGEL, J.; KELLER, J. J.; TARPY, D. R. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. **Insectes Sociaux**, v. 60, p. 65–73, 2013.
- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.
- RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes*

- patula L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304–307, 2009.
- ROCHA, A. G. et al. Lethal Effect and Behavioral Responses of Leaf-Cutting Ants to Essential Oil of *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) and Its Nanoformulation. **Neotropical Entomology**, v. 47, p. 769–779, 2018.
- ROMO-CHACÓN, A. et al. Evaluation of Oregano (*Lippia berlandieri*) Essential Oil and Entomopathogenic Fungi for *Varroa destructor* Control in Colonies of Honey Bee, *Apis mellifera*. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 4, p. 971–982, 2016.
- 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.
- RUCKER, R. R.; THURMAN, W. N.; BURGETT, M. Honey bee pollination markets and the internalization of reciprocal benefits. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 94, n. 4, p. 956–977, 2012.
- RUCKER, R.; THURMAN, W. Colony Collapse Disorder: The Market Response to the Bee Disease. **PERC Policy Series**, n. PS-50, p. 1–31, 2012.
- SABAHI, Q. et al. Continuous release of oregano oil effectively and safely controls *Varroa destructor* infestations in honey bee colonies in a northern climate. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 3, p. 1–13, 2017.
- SAMUELS, R. I.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 2, p. 403–412, 1988.
- SÁNCHEZ-BAYO, F. et al. Are bee diseases linked to pesticides ? — A brief review. **Environment International**, v. 89–90, p. 7–11, 2016.
- SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - A risk assessment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- SANFORD, M. T. Pollination of Citrus by Honey Bees. **University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences**, p. 1–8, 2003.
- SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R. N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 762–768, 2015.
- SANTOS, T. S. et al. Evaluation of Isolates of Entomopathogenic Fungi in the Genera *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Isaria*, and Their Virulence to *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) Evaluation of isolates of entomopathogenic fungi in the genera *Metarhizium*, B. **Florida Entomologist**, v. 101, n. 4, p. 597–602, 2018.
- 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, n. 1, p. 1–9, 2012.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413–423, 2003.
- SILVA, P. H. DA et al. Ação biocida de óleos vegetais em ovos e ninfas da mosca-branca-do-cajueiro e operárias adultas de *Apis mellifera* L. p. 1–4, 2007.
- SILVA, S. DE M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 159, 2006.
- SMODIŠ ŠKERL, M. I.; KMECL, V.; GREGORC, A. Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 125–128, 2010.
- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC : Mode of action classification and insecticide

- resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.
- STAVELEY, J. P. et al. A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 20, n. 2, p. 566–591, 2014.
- STENGER, L. D. **ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* , SOBRE O PARASITOIDE DE OVOS *Cleruchoides noackae* E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM *Eucalyptus benthamii* ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* , SOBRE O PARASITOIDE DE OVOS *Cleruchoides noackae* E N.** [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
- TARPY, D.; HATCH, S.; FLETCHER, D. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **Animal behaviour**, v. 59, n. 1, p. 97–101, 2000.
- TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. **Naturwissenschaften**, v. 100, p. 723–728, 2013.
- TARPY, D. R.; SIMONE-FINSTROM, M.; LINKSVAYER, T. A. Honey bee colonies regulate queen reproductive traits by controlling which queens survive to adulthood. **Insectes Sociaux**, p. 1–7, 2015.
- THACKER, J. An Introduction to Arthropod Pest Control. In: **Cambridge University Press**. [s.l.: s.n.]. p. 623–626.
- THANY, S. H. 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.
- THOMAS, M. B.; READ, A. F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews Microbiol**, v. 5, p. 377–383, 2007.
- TOFILSKI, A.; CZEKONSKA, K. Emergency queen rearing in honeybee colonies with brood of known age. **Apid**, v. 35, p. 275–282, 2004.
- TOMASETTO, F. et al. Intensified agriculture favors evolved resistance to biological control. **PNAS**, v. 114, n. 15, p. 3885–3890, 2017.
- TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide , thiamethoxam , alters honey bee activity , motor functions , and movement to light. **Nature Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.
- UCHÔA, F. DE A. B. et al. Effect of weight of Africanized queens ( *Apis mellifera* L . ) at birth in honey production in semi-arid Piauiense. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2012.
- VALENCIA, J. W. A. et al. Cytotoxic Activity of Fungal Metabolites from the Pathogenic Fungus *Beauveria bassiana* : An Intraspecific Evaluation of Beauvericin Production. **Current Microbiology**, v. 63, p. 306–312, 2011.
- VALERO-JIMÉNEZ, C. A. et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 41–49, 2016.
- VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39–59, 2018.
- VANENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: A descriptive study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, 2009.
- VANENGELSDORP, D. et al. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact



- honey bee pathophysiology. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–24, 2017.
- VANENGELSDORP, D.; OTIS, G. W. Application of a Modified Selection Index for Honey Bees ( Hymenoptera : Apidae ) Application of a Modified Selection Index for Honey Bees ( Hymenoptera : Apidae ). **Journal of economic entomology**, v. 93, n. 6, p. 1606–1612, 2000.
- VANENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; HAYES, J. Losses in the Winter of 2006 – 2007 : A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**, n. September 2006, p. 1–5, 2007.
- VIZZOTTO, M. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. [s.l: s.n.].
- WANG, C.; LEGER, R. J. S. The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects , and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants □. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 808–816, 2007.
- WANG, C.; WANG, S. Insect Pathogenic Fungi : Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. **Annual Review of Entomology**, v. 62, p. 73–90, 2017.
- WATSON, K.; STALLINS, J. A. Honey Bees and Colony Collapse Disorder : A Pluralistic Reframing. **Geography Compass**, v. 10, n. 5, p. 222–236, 2016.
- WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils AND. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1737–1742, 2007.
- WOYKE, J. Correlations Between the Age at Which Honeybee Brood was Grafted , Characteristics of the Resultant Queens , and Results of Insemination. **Journal of Apicultural Research**, v. 10, n. 1, p. 45–55, 1971.
- XAVIER, V. M. et al. Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honey bees. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2015.
- YU, Q.; POWLES, S. Update on Metabolic Herbicide Resistance Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds : A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production 1. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1106–1118, 2014.
- ZHU, B. C.-R. et al. Toxicity and Repellency of Patchouli Oil and Patchouli Alcohol against Formosan Subterranean Termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4585–4588, 2003.