



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA LIBARDONI

SELETIVIDADE DE AGENTES DE CONTROLE DE PRAGAS
***A Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Londrina
2021

GABRIELA LIBARDONI

SELETIVIDADE DE AGENTES DE CONTROLE DE PRAGAS
***A Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Curso de Doutorado da Universidade Estadual de Londrina, área de concentração Fitossanidade/Entomologia, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. Oliveira
Janeiro Neves.

Coorientador: Michele Potrich.

Londrina
2021

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

Libardoni, Gabriela.

Seletividade de agentes de controle de pragas a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) / Gabriela Libardoni. - Londrina, 2021.

98 f. : il.

Orientador: Pedro M. Oliveira Janeiro Neves.

Coorientador: Michele Potrich.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Abelhas africanizadas - Tese. 2. fungos entomopatogênicos - Tese. 3. pólen BT - Tese. 4. Produtos fitossanitários sintéticos - Tese. I. M. Oliveira Janeiro Neves, Pedro . II. Potrich, Michele. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

GABRIELA LIBARDONI

SELETIVIDADE DE AGENTES DE CONTROLE DE PRAGAS
A Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

Tese de doutorado apresentado à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro M. Oliveira Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Michele Potrich
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- UTFPR

Prof. Dr. Elio Cesar Guzzo
Embrapa Tabuleiros Costeiros - EMBRAPA

Prof. Dr. Geraldo Carvalho
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Prof^a. Dra. Fabiana Martins Costa-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- UTFPR

Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de dezembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela minha saúde e por ter me dado forças para não desistir dessa caminhada.

À minha filha, Laura Maria, que é nela que eu encontro forças para acordar todos os dias e vencer todas as batalhas.

Aos meus pais Dalmo e Vera, pelo exemplo e educação que me deram, por estarem ao meu lado sempre e em todas as minhas decisões. Ao meu irmão Felipe, que sempre tem as palavras certas, na hora certa e que nunca me deixou desistir.

Ao meu cônjuge, Jackson, que não mediu esforços para me ajudar, inclusive indo pro laboratório fazer análise e coleta de dados de madrugada, compreendendo sempre os momentos de ausência.

À minha co-orientadora, Michele Potrich, que além de orientar, ensinar e confiar, ela é uma super mãe científica.

Ao meu orientador, professor Pedro Neves, por ter confiado em mim, e dado todo suporte e auxílio.

Aos professores Everton, Fabiana, Edgar e Patrícia, por todo apoio na realização de experimentos, análise de dados e também pelos cafezinhos.

Aos meus irmãos de laboratório, Fernanda, Rodrigo, Raiza e Amanda, pelo ombro amigo, por passarem raiva comigo durante a montagem de algum experimento que não deu certo, e por não me deixarem desistir.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico e também da UNEPE Apicultura, que não mediram esforços para ajudar durante os experimentos.

Aos meus amigos, compadres e comadres, que nos momentos de extremo stress e ansiedade sempre estiveram ao meu lado com um ombro amigo ou oferecendo uma cerveja.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos e a Universidade Estadual de Londrina, pela disponibilização da infraestrutura e laboratórios para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos.

Enfim, a todos os meus colegas, amigos e familiares que, direta ou indiretamente, auxiliaram e não foram citados acima,

MUITO OBRIGADA!

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana”.

Albert Einstein

LIBARDONI, Gabriela. **Seletividade de agentes de controle de pragas a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2021. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Anualmente, observa-se uma diminuição do número de colônias da abelha africanizada, *Apis mellifera* L. e, acredita-se, que possa ser devido principalmente, à utilização intensiva e por vezes abusiva de produtos fitossanitários sintéticos. Como alternativa para a redução na utilização de inseticidas fitossanitários sintéticos no controle de insetos-praga, cada vez mais tem se buscado o Manejo Integrado de Pragas, com ênfase no controle biológico com o uso de entomopatógenos e a utilização de plantas resistentes (transgênicas), diminuindo o impacto aos insetos benéficos. Porém, existem poucos estudos sobre a seletividade dos entomopatógenos, de plantas transgênicas e de inseticidas oriundos de dois grupos químicos sobre *A. mellifera* africanizada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a seletividade de produtos à base de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Isaria fumosorosea*, além de pólen de plantas transgênicas e do inseticida sintético tiametoxam (neonicotinoide) + lambda cialotrina (piretroide) (Engeo Pleno®), a operárias de *A. mellifera* africanizada, analisando a longevidade, comportamento e a interferência nas estruturas dos tecidos. Para isto, foram realizados três experimentos: 1) Segurança de produtos biológicos à base de fungos entomopatogênicos para *A. mellifera* africanizada, no qual avaliou-se a longevidade através de contato direto, contato com superfície tratada e alimentação. Além disso foi avaliada a capacidade de caminhamento e voo das abelhas tratadas com os produtos, bem como o efeito residual de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, em campo. Neste bioensaio, os produtos se mostraram seguros, sendo *T. harzianum* o mais seletivo. 2) Efeitos letais e subletais de pólen transgênico para operárias de *A. mellifera* africanizada, no qual avaliou-se a longevidade, o comportamento e alterações no mesêntero após alimentação com o pólen de diferentes cultivares. Neste bioensaio o pólen das cultivares testadas se mostrou seguro, não causando efeitos letais às operárias de *A. mellifera* africanizada, porém causou leves alterações nas fibras musculares externas do intestino médio quando estas foram alimentadas com o pólen de milho transgênico MG600PW e com o pólen de milho MG580PW. 3) Efeitos letais, subletais e residuais de tiametoxam + lambda cialotrina sobre operárias de *A. mellifera* africanizada. Para isto, foram avaliadas a longevidade, o voo, o caminhamento e o efeito residual do produto a campo. O produto não se mostrou seletivo às abelhas pois, mesmo na menor concentração testada (0,625%), causou redução na longevidade das abelhas e alterou o comportamento, além disso, apresentou efeito residual de até 18 dias, não sendo seguro para as abelhas. Desta forma, esses testes devem ser contínuos devido à importância que as abelhas têm nas diversas culturas.

Palavras-chave: abelha africanizada; fungos entomopatogênicos; pólen de plantas transgênicas; tiametoxam + lambda cialotrina (Engeo Pleno®); segurança.

LIBARDONI, Gabriela. **Selectivity of pest control agents to *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2021. 98 p. Thesis (Post graduate Program in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Annually, there is a decrease in the number of colonies of the Africanized bee, *Apis mellifera* L., and it is believed to be mainly due to the intensive and sometimes abusive use of synthetic phytosanitary products. As an alternative to reduce the use of synthetic phytosanitary insecticides in the control of pest insects, Integrated Pest Management has been increasingly sought, with emphasis on biological control with the use of entomopathogens and the use of resistant (transgenic) plants, decreasing the impact to beneficial insects. However, there are few studies on the selectivity of entomopathogens, transgenic plants and insecticides from two chemical groups on Africanized *A. mellifera*. Thus, the aim of this study was to evaluate the selectivity of products based on *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* and *Isaria fumosorosea*, in addition to pollen from transgenic plants and the synthetic insecticide thiamethoxam (neonicotinoid) + lambda cyhalothrin (pyrethroid) (Engeo Pleno[®]), to the Africanized *A. mellifera* workers, analyzing longevity, behavior and interference in tissue structure. For this, three experiments were carried out: 1) Safety of biological products based on entomopathogenic fungi for Africanized *A. mellifera*, in which longevity was evaluated through direct contact, contact with treated surface and feeding. In addition, the ability to walk and fly of the bees treated with the products was evaluated, as well as the residual effect of *B. bassiana* and *I. fumosorosea*, in the field. In this bioassay, the products proved to be safe, with *T. harzianum* being the most selective. 2) Lethal and sublethal effects of transgenic pollen on Africanized *A. mellifera* workers, in which longevity, behavior and changes in the mesentery after feeding with pollen from different cultivars were evaluated. In this bioassay, the pollen of the tested cultivars proved to be safe, not causing lethal effects to Africanized *A. mellifera* workers, but caused slight alterations in the external muscle fibers of the midgut when they were fed with transgenic maize pollen MG600PW and with pollen from MG580PW corn. 3) Lethal, sublethal and residual effects of thiamethoxam + lambda cyhalothrin on Africanized *A. mellifera* workers. For this, longevity, flight, walking and the residual effect of the product in the field were evaluated. The product was not selective for bees because even at the lowest concentration tested (0.625%) it caused a reduction in the longevity of bees and changed their behavior, in addition, it showed a residual effect of up to 18 days, not being safe for bees. Thus, these tests must be continuous due to the importance that bees have in different cultures.

Key-words: africanized bee; entomopathogenic fungi; pollen from transgenic plants; thiamethoxan + lambda cyhalothrin (Engeo Pleno[®]); safety.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Figura 3.1. Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após ingestão dos produtos incorporados à dieta. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank 36
- Figura 2** – Figura 3.2. Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após aplicação tópica dos produtos biológicos por pulverização. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank..... 37
- Figura 3** – Figura 3.3 Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície tratada com os produtos. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank 38
- Figura 4** – Figura 3.4. Deslocamento vertical (voo vertical e queda livre) de abelhas operárias de *Apis mellifera*, após contato com superfície tratada com os produtos biológicos. T1 (Controle); T2 (*B. bassiana*); T3 (*I. fumosorosea*); T4 (*M. anisopliae*) e T5 (*T. harzianum*). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)..... 39
- Figura 5** – Figura 3.5. Caminho percorrido pelas abelhas operárias de *Apis mellifera*, 24 horas após contato com superfície vítrea pulverizada com os produtos à base de fungos 41
- Figura 6** – Figura 4.1 – Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera*, por Kaplan-Meier, ajustado ao período (horas) após a alimentação com pasta Cândi contendo os tratamentos 51
- Figura 7** – Figura 4.2. Deslocamento vertical (voo vertical e queda livre) de abelhas operárias de *Apis mellifera*, 96h após a alimentação com os diferentes tratamentos, somente pasta Cândi (T1),

- pólen de milho não Bt. misturado na pasta Cândi (T2), T3 (milho Bt MG600PW), T4 (Milho Bt MG580PW) e T5 (Milho Bt FÓRMULA). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)..... 52
- Figura 8** – Figura 4.3 Micrografia eletrônica de varredura do intestino médio de operárias de *A. mellifera*, após ingestão da pasta Cândi pura (A) – T1; incorporada com pólen de milho convencional (B) – T2; incorporada com pólen de milho MG600PW (C) – T3; pólen de milho MG580PW (D) – T4. cl: conteúdo do lúmen; flecha: membrana peritrófica; es: epitélio simples (uma só camada) prismático (ou colunar ou cilíndrico); fm: fibras musculares da camada longitudinal (externa) e fibras musculares da camada circular (interna); mr: musculatura rompida; mf: musculatura deformada e frouxa; md: fibra muscular dilatada; dm: musculatura deformada..... 54
- Figura 9** – Figura 5.1: Croqui da área onde estava plantada a soja, com os períodos de aplicação do produto sobre as plantas, em cada talhão 63
- Figura 10** – Figura 5.2. Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície vítrea tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank 65
- Figura 11** – Figura 5.3: Retomada de voo (queda) e deslocamento vertical (voo) de abelhas operárias recém-emergidas (*Apis mellifera*), após contato com superfície tratada com a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, a 0,625% e 10% da concentração recomendada pelo fabricante. Os quadrados representam os valores medianos dos estratos para cada tratamento com os respectivos primeiro e terceiro quartis. As mesmas letras minúsculas dentro das figuras indicam que não

	houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) para o teste de comparação de múltiplos de Tukey.....	66
Figura 12	– Figura 5.4: Trajeto percorrido pelas abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> após contato com superfície tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina. Em vermelho, locais onde a abelha ficou mais tempo em descanso.....	67
Figura 11	– Figura 5.5: Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> , de Kaplan – Meier, ajustado ao período (h) após contato com folhas de soja pulverizadas com a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, em diferentes tempos, para avaliar o efeito residual do produto. Temperatura ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $60\% \pm 10\%$; fotoperíodo de 12 h). As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$)	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Tabela 3.1: Produto comercial, agente de controle, formulação, dosagem recomendada pelo fabricante e organismo alvo 31
- Tabela 2** – Tabela 3.2. Níveis (estratos) de acordo com teste de deslocamento vertical e de queda livre 34
- Tabela 3** – Tabela 3.3. Sobrevivência (%) de operárias de *A. mellifera*, em contato com residual dos produtos biológicos em superfície tratada 39
- Tabela 4** – Tabela 3.4. Velocidade média (mm/s), distância percorrida (mm), tempo (s) de descanso e tempo (s) de caminhamento de abelhas *Apis mellifera*, 24 horas após contato com superfície tratada com os produtos..... 40
- Tabela 5** – Tabela 4.1. Níveis (estratos) de acordo com teste de deslocamento vertical e de queda livre. (Tomé et al. 2015) 49
- Tabela 6** – Tabela 5.1: Tratamentos utilizados com as diferentes concentrações da mistura tiametoxan (14,1% m/v neonicotinoide) + lambda cialotrina (10,6% m/v piretroide) + nafta de petróleo (7,27% m/v) + outros Ingredientes (87,2 m/v) (Engeo Pleno®)..... 60
- Tabela 7** – Tabela 5.2: Velocidade média das operárias de *A. mellifera* africanizada (mm/s), distância percorrida (mm), tempo (s) de caminhamento e tempo (s) de descanso das abelhas operárias recém-emergidas (24 horas) h entrarem em contato com superfície tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxan + lambda cialotrina + nafta de petróleo + outros ingredientes [\pm desvio padrão (DP)]..... 67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	O SETOR APÍCOLA.....	17
2.2	BIOLOGIA E COMPORTAMENTO SOCIAL DE <i>APIS MELLIFERA</i>	18
2.3	A POLINIZAÇÃO E A PRODUÇÃO AGRÍCOLA.....	21
2.4	DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS E MORTALIDADE DAS ABELHAS.....	22
2.5	PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS (PFSS) E A RELAÇÃO COM AS ABELHAS.....	25
2.6	CONTROLE BIOLÓGICO E <i>APIS MELLIFERA</i>	26
2.6.1	Fungos Entomopatogênicos.....	27
2.6.2	Fungos do Gênero <i>Trichoderma</i>	29
2.7	PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (OGMs).....	29
3	CAPÍTULO A: SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA	31
3.1	INTRODUÇÃO.....	31
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.1	Obtenção das Abelhas e dos Produtos Comerciais.....	32
3.1.2	Bioensaios de Ingestão, Aplicação Tópica, Contato e Residual.....	33
3.1.3	Deslocamento Vertical.....	36
3.1.4	Movimentação de <i>A. mellifera</i> após Contato com os Produtos Biológicos.....	37
3.1.5	Análises Estatísticas.....	38
3.3	RESULTADOS.....	38
3.3.1	Sobrevivência.....	38
3.3.2	Deslocamento Vertical.....	42
3.3.3	Movimentação de <i>A. mellifera</i> após Contato com os Produtos	

	Biológicos.....	43
3.4	DISCUSSÃO.....	45
3.5	CONCLUSÃO.....	49
4	CAPÍTULO B: O PÓLEN DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO PARA EXPRESSÃO DE TOXINAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> CAUSA EFEITOS LETAL OU SUBLETAIS EM OPERÁRIAS DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)?	50
4.1	INTRODUÇÃO.....	50
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.2.1	Obtenção das Abelhas e do Pólen.....	51
4.2.2	Análise de Sobrevivência.....	52
4.2.3	Deslocamento Vertical e Queda Livre.....	53
4.2.4	Efeito das Planas Geneticamente Modificadas sobre o Mesêntero das Operárias de <i>A. mellifera</i>	54
4.2.5	Análises Estatísticas.....	54
4.3	RESULTADOS.....	55
4.3.1	Sobrevivência.....	55
4.3.2	Deslocamento Vertical e Queda Livre.....	56
4.3.3	Alterações do Mesêntero das Operárias de <i>A. mellifera</i>	57
4.4	DISCUSSÃO.....	60
4.5	CONCLUSÃO.....	62
5	CAPÍTULO C: EFEITOS LETAI, SUBLETAIS E RESIDUAIS DE ENGEÓ PLENO® SOBRE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA	64
5.1	INTRODUÇÃO.....	64
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
5.2.1	Obtenção das Abelhas e do Produto.....	66
5.2.2	Contato de Abelhas em Superfície Contendo o Produto.....	67
5.2.3	Deslocamento Vertical e Retomada de Voo.....	67

5.2.4	Caminhamento.....	68
5.2.5	Efeito Residual (Semi Campo)	69
5.2.6	Análises Estatísticas	70
5.3	RESULTADOS	70
5.3.1	Contato Direto de Abelhas em Superfície Contendo o Produto	70
5.3.2	Deslocamento Vertical e Retomada de Voo.....	71
5.3.3	Caminhamento.....	73
5.3.4	Efeito Residual (Semi-Campo).....	73
5.4	DISCUSSÃO	75
5.5	CONCLUSÃO.....	77
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) são insetos sociais, por viverem em uma sociedade hierárquica (RUPPERT; BARNES, 1996). O interesse na manutenção das abelhas, principalmente em ambientes agrícolas, dá-se pela importância como polinizadores, contribuindo para o aumento da produção agrícola, resultando em maior produtividade e qualidade de sementes e frutos, além da produção de mel, geleia real, própolis e outros subprodutos (STRAUB, et al. 2016; THEODORAKI et al., 2017; ABOU-SHAARA; EID, 2019; GBESSO, et al., 2019).

Nos últimos anos, notou-se uma diminuição acentuada de colônias de abelhas, o fenômeno que recebeu o nome de Desordem do Colapso das Colônias (DCC), no qual essas abandonam a colmeia, e não são encontradas abelhas mortas ao redor das caixas, ou seja, ocorre o abandono parcial ou total das colônias. Algumas causas desta desordem estão relacionadas diretamente com as abelhas, como doenças fúngicas, viroses e bacterioses, além do ácaro parasita *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) (Andreson e Trueman, 2000) (GRACIA et al., 2017; POSADA-FLOREZ et al., 2020; BÚÚAERT et al., 2021).

Outro problema também conhecido e denominado mortalidade das abelhas. Nesse caso as abelhas são encontradas mortas em torno e dentro da colônia. E estudos avaliaram que as abelhas cujas colônias onde se constatou mortalidade, encontraram-se intoxicadas por produtos fitossanitários sintéticos (PFSs) como neonicotinoides, pirazois e piretroides (GRIGORI, 2019). A utilização massiva de PFSs para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, somada à produção agrícola intensiva, tem afetado cada vez mais as populações de abelhas, causando impactos também na qualidade e quantidade da geleia real produzida pelas abelhas nutrizas. Isso acaba por afetar diretamente a qualidade das rainhas e reduz a produção de mel e a possibilidade de polinização devido à contaminação das colônias, provocando alterações fisiopatológicas e comportamentais dos insetos (POTTS, et al. 2015; VANENGELSDORP et al., 2017; MILONE; CHAKRABARTI; SAGILI; TARPY, 2021).

A intoxicação das abelhas com PFSs causa efeitos negativos diretos na

produção agrícola, reduzindo a polinização e afetando a apicultura como um todo, que é fonte de renda para muitos produtores (SILVA; BRITO, 2015; HOOD, 2019; PRENDERGAST; LECLERCQ; VEREECKEN, 2021).

Além de afetar as populações de abelhas, a intensificação do uso dos PFSs acarreta em uma série de problemas, como o aparecimento de populações de insetos-praga resistentes e redução de inimigos naturais (TIAN et al., 2019; MANSOUR; BIONDI, 2020). Desta forma, é preciso encontrar um equilíbrio entre as cadeias produtivas e o desenvolvimento de programas que auxiliem a conservação e preservação das abelhas, caso contrário, ocorrerá cada vez mais uma redução da polinização que, por consequência, prejudicará a cadeia agrícola e até mesmo levará ao desaparecimento de algumas espécies vegetais polinizadas exclusivamente por elas (OLIVEIRA, 2015; PIRES et al., 2016; CATARINO et al., 2019; DUFOUR; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2020).

A busca por esse equilíbrio biológico tem acontecido através da utilização de métodos de controle biológico, como os entomopatógenos, entre eles os fungos, bactérias, vírus e nematoides (ALVES, 1998), os quais têm a vantagem de ser menos agressivos quando aplicados, ao ambiente e aos organismos não-alvo, e são eficientes para ser incorporados ao manejo integrado de pragas (MIP) (GARRIDO-JURADO et al., 2019; ACHARYA et al., 2020; HAO et al., 2020).

Além disso, o agricultor vem utilizando cada vez mais organismos geneticamente modificados (OGMs), em especial plantas com incorporação de genes que expressam toxinas para o controle dos insetos, entre eles genes de *Bacillus thuringiensis*, como forma de aumento da produção e/ou quebra de resistência a herbívoros e doenças (FU et al., 2020). Porém, pouco se sabe se essas plantas geneticamente modificadas podem causar prejuízos a organismos não-alvo, como as abelhas (ARPAIA; SMAGGHE; SWEET, 2021), que entram em contato com o pólen dessas plantas, principalmente por ingestão.

Assim, sabendo da importância que as abelhas têm para os ecossistemas e para a produtividade agrícola, faz-se necessário testar os diferentes produtos para o controle de pragas, que podem afetar os organismos não-alvo, de maneira letal ou subletal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a seletividade de diferentes

entomopatógenos, variedades de milho transgênico e de um produto fitossanitário sintético, com os ingredientes ativos tiametoxam + lambda-cialotrina (Engeo Pleno®), todos utilizados na agricultura, sobre a longevidade e o comportamento de operárias de abelhas africanizadas de *A. mellifera*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SETOR APÍCOLA

Dentro das atividades rurais, o setor apícola vem se desenvolvendo com a melhoria das técnicas de manejo, do fortalecimento da cadeia produtiva como um todo e com a comercialização nacional e internacional dos produtos derivados das abelhas (ABEMEL, 2016).

No ano de 2019, a produção de mel no Brasil foi de 46 mil toneladas, tendo um aumento de 8,5% em relação ao ano de 2018, o que totalizou R\$ 493,7 milhões (IBGE, 2020). De acordo com esses dados, ressalta-se que a apicultura é uma geradora de renda na agricultura, além de ter importância na agricultura familiar e de pequenos agricultores, os quais vêm sendo incentivados pelo governo a desenvolver a agricultura orgânica, o que favorece ainda mais a apicultura e a produção agrícola, por utilizar no controle de pragas produtos que são mais seguros ao homem e ao meio ambiente.

No Brasil, a maior produção de mel é na região Sul, com 38,2% do total, seguida da região Nordeste, com 34,3%, e Sudeste, com 21,4%. O Paraná e o Rio Grande do Sul são os estados com maior produção de mel, gerando um faturamento de R\$ 85,6 mil e 80,21 mil reais, respectivamente para estes estados (IBGE, 2020).

Além do aspecto relacionado diretamente com a produção de mel e outros produtos oriundos da atividade apícola, as abelhas também são responsáveis pelo processo de polinização (COSTA; OLIVEIRA, 2013), que pode ocorrer como polinização cruzada, na qual a planta transfere o pólen de uma flor para outra, podendo ser da mesma planta ou de outra da mesma espécie, ou ainda, pela autopolinização, quando o pólen é transferido da antera para o estigma da mesma flor (SANTOS et al., 2009).

2.2 BIOLOGIA E COMPORTAMENTO SOCIAL DE *APIS MELLIFERA*

As abelhas *A. mellifera* pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenoptera e à família Apidae. São insetos sociais, pois vivem em sociedade hierárquica, na qual cada indivíduo desempenha funções específicas, garantindo o sucesso e o desenvolvimento da colônia (RUPPERT; BARNES, 1996).

Apresentam exoesqueleto de quitina e o corpo dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se órgãos sensoriais, olhos, antenas e pelos/cerdas sensitivos, os olhos (simples e compostos), e as antenas. O aparelho bucal é diferenciado, do tipo lambedor, e, internamente, glândulas como as mandibulares, auxiliam no processamento da geleia real e dissolvem a cera e as glândulas hipofaríngeas processam o alimento comum em geleia real e têm sua maior atividade geralmente do quinto ao 12º dia de vida da operária (COUTO; COUTO, 2002; CRUZ-LANDIM, 2009).

O tórax é formado por três segmentos: o protórax, o mesotórax e o metatórax (WINSTON, 2003). No tórax localizam-se os órgãos locomotores, pernas e asas, além de pelos, que têm função na ancoragem dos grãos de pólen no momento da polinização, assim como o último par de pernas, também utilizado para o carregamento dos grãos de pólen até a colônia (BOMFIM et al., 2017).

O abdômen é formado por segmentos e é flexível o que auxilia o movimento do mesmo (BOMFIM et al., 2017). Nele encontram-se órgãos do aparelho digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa e glândulas produtoras de cera e, no final, o órgão de defesa das abelhas, o ferrão que é utilizado para defesa tanto da abelha em si, como da colônia (RAMOS; CARVALHO, 2017).

O sistema digestivo das abelhas é dividido em três partes: estomodeu ou intestino anterior, onde ocorre a digestão mecânica; proctodeu ou intestino posterior, onde ocorre a digestão química e parte da absorção e mesêntero ou intestino médio (ventrículo), onde o restante da digestão ocorre (CRUZ-LANDIM, 2009; BOMFIM et al., 2017). As células do intestino médio das abelhas são caracterizadas por serem colunares, com grande número de invaginações, o que aumenta a superfície de

contato e, conseqüentemente, a capacidade de absorver os nutrientes (RAES et al., 1994). Além disso, apresentam um grande número de células endócrinas secretoras de enzimas e células regenerativas, pois, como nessa região do corpo ocorre muita ação de enzimas, desgastes, choques mecânicos, e pela atividade secretora e absorptiva, suas células precisam ser constantemente renovadas (CRUZ-LANDIM, 2009).

Nas colônias de abelhas encontram-se três tipos de castas com funções e características distintas: a rainha, as operárias e os zangões. Uma colônia saudável possui, aproximadamente, 60.000 a 80.000 operárias, que vivem até 40 dias, uma rainha, que pode viver até cinco anos, e de zero a 400 zangões, que vivem, em média, 90 dias (BOMFIM et al., 2017).

Quando a rainha coloca ovos sem liberar os espermatozoides da espermateca ou então, quando as operárias colocam ovos, estes não serão fecundados e darão origem aos zangões, machos da colônia e indivíduos haploides (MOREIRA; FARINHA, 2011). Quando o ovo colocado pela rainha é fecundado, ele poderá dar origem a abelhas operárias ou abelhas rainhas, indivíduos diploides (RUPPERT; BARNES, 1996; RAMOS; CARVALHO, 2017).

O número de zangões presentes na colônia varia de acordo com a qualidade e quantidade de alimento (BOMFIM et al., 2017). Em situações mais críticas, como no inverno ou quando há uma diminuição da oferta de alimento no campo, quando as colônias ficam enfraquecidas, os zangões podem ser expulsos pelas operárias (RAMOS; CARVALHO, 2017). Os zangões dependem das operárias para sobreviver, pois estas fornecem o alimento, sendo que os zangões têm a função de acasalar com a rainha recém emergida, podendo ajudar na manutenção da temperatura interna da colônia (MOREIRA; FARINHA, 2011; STRAUB et al., 2016; RAMOS; CARVALHO, 2017).

Dentro das colônias, encontra-se apenas uma abelha rainha. Ela tem por função a reprodução e a oviposição. Uma abelha rainha jovem coloca em média 2.000 ovos por dia e, conforme vai envelhecendo, esse número vai diminuindo (RAMOS; CARVALHO, 2017). Uma rainha costuma viver em média cinco anos, é ela quem controla a organização e unidade de toda sua colônia através da liberação de

feromônios (GULLAN; CRANSTON, 2009). A rainha pode ser considerada uma operária que atingiu a maturidade sexual, pois assim como as operárias, elas nascem de um ovo fecundado, sendo o que as diferencia a alimentação no estágio larval, onde larvas alimentadas somente com geleia real, que contém uma grande quantidade de proteínas, vitaminas e hormônios sexuais, sofrem diferenciação para rainhas (MOREIRA; FARINHA, 2011). Também, qualquer larva de abelha alimentada, antes dos três dias de vida, com a geleia real, pode virar abelha rainha (RAMOS; CARVALHO, 2017).

Uma rainha de *A. mellifera* leva em torno de 15 a 16 dias para emergir, e, após a emergência, existe um grupo de abelhas operárias responsáveis por alimentá-la com a geleia real, e por manter a sua higiene (WINSTON, 2003). A partir do nono dia, já está pronta para realizar o voo nupcial, podendo se acasalar com vários zangões, armazenando na espermateca os espermatozoides de todos por toda a sua vida (RAMOS; CARVALHO, 2017).

As operárias são abelhas fêmeas responsáveis por todas as funções de manutenção, higiene e proteção da colônia (RUPPERT; BARNES, 1996; MOREIRA; FARINHA, 2011). Essas funções são realizadas de acordo com a idade das abelhas operárias (RAMOS; CARVALHO, 2017). As operárias mais novas ficam apenas dentro da colônia, do primeiro dia de vida ao quinto, ficam responsáveis pela limpeza e reforma dos alvéolos, do quinto ao décimo dia, são chamadas de abelhas nutrizas, pois são as responsáveis por alimentar as larvas da colônia. Do décimo ao vigésimo dia, as operárias produzem cera para construir os favos, recebem e desidratam o néctar coletado, elaboram o mel, limpam o lixo da colmeia. Existe ainda um grupo de abelhas operárias, também com a idade entre 10 e 20 dias, chamadas de amas, que são as responsáveis por cuidar, higienizar e alimentar a rainha. Já dos 18 aos 20 dias de vida, são responsáveis pela proteção da colônia, são abelhas guarda, e, a partir dos 21 dias até o fim da vida (em torno de 28 dias), elas vão para fora do ninho para forragear, ir em busca de alimento, coleta de néctar, pólen, resinas e água para o bom desenvolvimento da colônia (GULLAN; CRANSTON, 2009; MOREIRA; FARINHA, 2011; BOMFIM et al., 2017; RAMOS; CARVALHO, 2017). Estes períodos de atividades em relação à idade podem ser flexíveis e variar de acordo com a

demanda e situação em que a colônia se encontra (ROCHA, 2008).

2.3A POLINIZAÇÃO E A PRODUÇÃO AGRÍCOLA

O forrageamento acontece quando as abelhas vão em busca de pólen, néctar e água no ambiente (AL-GHAMDI; et al., 2016). No momento em que elas realizam a coleta de alimento, visitam diferentes flores e realizam a polinização (XIE; WANG; PAN; AN, 2019).

A maioria das plantas necessita da polinização para se reproduzir, e parte das plantas cultivadas depende de insetos para que esse processo ocorra. Dentro do grupo de insetos polinizadores, as abelhas *A. mellifera* são responsáveis por perpetuar, por meio da polinização, várias espécies vegetais, aumentando diretamente a qualidade e quantidade da produção de frutos e sementes (BALLANTYNE et al., 2017; CATARINO; et al., 2019).

Assim, a baixa quantidade de insetos polinizadores em ambientes agrícolas pode afetar diretamente a produtividade e a qualidade da produção. No cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), a presença de abelhas polinizadoras *A. mellifera* aumenta a qualidade dos frutos, em relação ao peso e ao número de sementes, e a produtividade. Cerca de 40% dos frutos de flores que não tiveram contato com os polinizadores foram abortados no início do desenvolvimento, sendo que nas flores onde as abelhas tinham livre acesso, todos os frutos formados se desenvolveram (VINÍCIUS-SILVA et al., 2017).

No cultivo da macieira, *Malus domestica* Borkh (Rosaceae), pode ocorrer diferença na qualidade de frutos e, conseqüentemente, no lucro do produtor quando com manejo adequado. A produtividade pode aumentar, gerando um aumento da rentabilidade de até 70%, pois os frutos produzidos, quando há visitaçã das abelhas *A. mellifera*, têm aumento de sementes e do teor de açúcar, tornando-se mais apreciados para o mercado consumidor (GESLIN et al., 2017; WU et al., 2021).

Em morangos, a presença de insetos polinizadores, faz com que a

porcentagem de frutificação seja maior em relação às plantas que não recebem a visitação desses agentes polinizadores. Além disso, os frutos obtidos das plantas polinizadas são de melhor qualidade e maiores, em comparação com aqueles das flores sem visitação (ABROL et al., 2017; SARĐDAŞ et al., 2021).

A presença de abelhas nos cafeeiros, *Cafe arabica*, aumenta a qualidade dos frutos e, por isso, é importante manter proporções adequadas de habitats seminaturais e/ou o número de colmeias nos campos agrícolas, de acordo com a floração dessa cultura (HIPÓLITO et al., 2020; SAMNEGÅRD, 2020). Diversas outras espécies de cultivo autopolinizáveis, incluindo algodão, soja, canola, e o próprio café podem se autopolinizar, mas a cada dia aparecem mais estudos que aumentam as evidências de que essas plantas também podem se beneficiar da polinização cruzada por insetos, como as abelhas (ESQUIVEL; PARYS; BREWER, 2021; KHALIFA ET AL., 2021). Assim, há interesse na manutenção das abelhas, principalmente em meios agrícolas, pois, além de serem importantes polinizadores, contribuem para o aumento da produção e qualidade de sementes e frutos (FAO, 2018; PERERA; KARUNARATNE, 2019; LI et al., 2020).

No entanto, quando as abelhas operárias saem da colônia para ir forragear, elas podem acabar entrando em contato com PFSs e com entomopatógenos (vírus, fungos, nematoides entomopatogênicos e as bactérias) utilizados para o controle de insetos-praga, podendo transportá-los para dentro da colônia (FRIES; CAMAZINE, 2001).

2.4 DESORDEM DO COLAPSO DAS COLÔNIAS E MORTALIDADE DAS ABELHAS

A diminuição das populações/colônias de abelhas recebe o nome de Desordem do Colapso das Colônias (DCC ou CCD - Colony Collapse Disorder). A primeira citação desse fenômeno foi em 2006, quando a apicultura dos Estados Unidos teve um enorme declínio com o desaparecimento de diversas colônias, além de prejuízos na agricultura com a diminuição da polinização (COSTA-MAIA et al., 2010).

Nos Estados Unidos, desde 2007 vêm sendo feitas análises comparativas do número de colônias, de abelhas *A. mellifera* perdidas durante o inverno, sendo que entre 2006/2007, é citada uma redução de 32%, 2007/2008 de 36%, 2008/2009 de 29%, 2009/2010 de 32%, 2010/2011 de 30%, 2011/2012 de 22%, 2012/2013 de 30%, 2013/2014 de 24%, 2014/2015 de 22% e de 2015/2016 de 27%. Estes valores são expressivos e despertam preocupação dos apicultores. Entretanto, são dados apenas de perdas no inverno, porém no verão também ocorre a perda de algumas colônias. Quando combinados os valores de perda do verão e inverno de 2016/2017, os apicultores perderam 33,2% de suas colônias (KULHANEK et al., 2017)

Para ser considerada colônia perdida e contabilizada para a DCC, há a necessidade do abandono total da colônia, ou de uma rápida perda da população de abelhas adultas (HRISTOV; SHUMKOVA; PALOVA; NEOV, 2020). Podem ainda ser encontradas poucas ou nenhuma abelha adulta morta dentro ou fora da colônia e excesso de crias em relação à população de abelhas adultas. Pode ser observada a presença de rainha e a ausência de traça da cera (*Galleria mellonella*) (Lepidoptera: Pyralidae) ou outras pragas, como pequenos besouros, e quando, com frequência, ficam reservas de alimentos nas colônias (VANENGELSDORP et al., 2010).

No Brasil, as primeiras observações de colônias com sintomas semelhantes à DCC observados nos Estados Unidos ocorreu em agosto de 2008, em duas colônias na região de Altinópolis (SP), onde observou-se muito alimento, poucas crias e abelhas adultas com a rainha, ausência de abelhas adultas mortas e de crias doentes (PIRES et al., 2016). Já em 2010, entre duas coletas de abelhas forrageiras (com intervalo de três dias), na USP de Ribeirão Preto (SP), foi possível observar a perda de duas colônias com sinais similares aos da DCC (MESSAGE et al., 2011). A partir daí, observaram-se perdas de colônias também nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Paraná e, a cada ano, um aumento na porcentagem de colônias perdidas (PIRES et al., 2016).

As possíveis causas da DCC ainda não estão completamente elucidadas, mas acredita-se que, dentre os fatores que desencadeiam esse processo, estão, por exemplo, os estresses causados por patógenos, manejo inadequado das colônias, uso de agrotóxicos, má nutrição e também, a junção de um ou mais destes fatores

(PIRES et al., 2016).

Dentre as causas naturais do desaparecimento das colônias, têm-se os patógenos, como fungos, vírus e bactérias, os parasitas e os predadores. Um parasita presente nas colônias de abelhas e considerado um problema apícola é o ácaro *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) (ANDERSON; TRUEMAN, 2000). Ele se reproduz apenas dentro das colmeias, sugando a hemolinfa e transmitindo doenças para as larvas, o que leva ao enfraquecimento da colônia e consequentemente permitindo a entrada de patógenos (COSTA-MAIA et al., 2010; DYNES et al., 2017; MOREIRA et al., 2017). Quanto aos patógenos de *A. mellifera*, são citadas doenças fúngicas, bacterianas e virais. Entre as bacterianas, destaca-se a cria pútrida americana causada por *Paenibacillus larvae* como uma das mais destrutivas (KRONGDANG; EVANS; CHEN; MOOKHPLOY; CHANTAWANNAKUL, 2018) e a cria pútrida europeia causada por *Melissococcus plutonius* (NAKAMURA; YAMAZAKI; SHIRAISHI; KOBAYASHI; HARADA; YOSHIYAMA; OSAKI; OKURA; TAKAMATSU, 2016). Entre as fúngicas, destaca-se a cria giz causada por *Ascosphaera apis* (YOUSEFI; FOUKS, 2019). Várias doenças virais são relatadas em abelhas adultas e crias, mas a mais importante é a cria ensacada “sacbrood” causada por *Morator aetatulas* (FAO, 2006; YONGSAWAS; CHAIMANEE; PETTIS; BONCRISTIANI JUNIOR; LOPEZ; IN-ON; CHANTAWANNAKUL; DISAYATHANOOWAT, 2020).

Outro importante fator que pode contribuir para a DCC é o estado nutricional e o manejo das colônias (PIRES et al., 2016; HRISTOV; SHUMKOVA; PALOVA; NEOV, 2020). Colônias em que o estado nutricional se encontra alterado, irão gerar crias com sistema imunológico debilitado, além de apresentarem baixa estocagem de alimento, o que afetará negativamente o desenvolvimento e, consequentemente, levará ao desaparecimento (DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN, 2015; HRISTOV; SHUMKOVA; PALOVA; NEOV, 2020). Além disso, a falta de manejo adequado também pode afetá-las, principalmente quando há um déficit de alimento e não é fornecida uma alimentação complementar, a utilização de quadros velhos, e quando não há substituição das rainhas, contribuindo para o enfraquecimento geral da colônia (HOLANDA-NETO et al., 2015).

Outro fator que afeta as colônias de abelhas, principalmente no Brasil, é o desmatamento, pois, ao se derrubar árvores, ninhos e enxames podem ser destruídos. Desta forma, além de reduzir a oferta de alimento, pela derrubada das matas, e reduzir os locais para nidificação, ocorre uma estratificação das florestas, reduzindo também a variabilidade genética das espécies das abelhas (WALDSCHMIDT et al., 2005; COSTA-MAIA et al., 2010; WAKGARI; YIGEZU, 2021).

No Brasil, nos últimos anos, além da DCC, vem ocorrendo mortalidade das abelhas, dentro e, principalmente, ao redor da caixa da colmeia. A principal causa desse fenômeno está associada à intoxicação causada pelos PFSs, como os neonicotinoides e os pirazois (GRIGORI, 2019).

Os PFSs são caracterizados pela mortalidade direta, levando as abelhas à morte imediata após o contato, ou, em doses subletais, causar efeitos colaterais que afetam o comportamento, o desenvolvimento, o sistema imunológico, entre outros (AMARO; GODINHO, 2012; FREITAS; PINHEIRO, 2012).

2.5

PRODUTO

S FITOSSANITÁRIOS SINTÉTICOS (PFSs) E A RELAÇÃO COM AS ABELHAS

A classe de PFSs mais utilizada na agricultura para o controle de insetos são os neonicotinoides. Estes produtos são neurotóxicos, agindo na passagem do impulso nervoso, na sinapse das células nervosas, ligando-se aos receptores de acetilcolina e fazendo com que os impulsos nervosos passem de uma célula para a outra de forma ininterrupta, provocando uma hiperexcitação (GALLO et al., 2002). Abelhas operárias adultas de *A. mellifera* expostas a doses subletais (0,25 ou 0,50 ng) de imidacloprido (neonicotinoide), apresentaram prejuízo nas tarefas no interior da colônia, além de redução significativa na capacidade de voo e na atividade de forrageamento. Larvas que recebem o alimento contaminado apresentam morte celular apoptótica no intestino médio, deixando-as susceptíveis a patógenos

(SCHNEIDER et al., 2012; GOÑALONS; FARINA, 2015).

Piretroides sintéticos à base de deltametrina, também neurotóxicos, que atuam na passagem do impulso nervoso no interior dos neurônios, quando aplicados sobre as abelhas e incorporados na alimentação, foram tóxicos para *A. mellifera*, reduzindo a sobrevivência e prejudicando o desempenho das funções das operárias dentro das colônias (GALLO et al., 2002; CARVALHO et al., 2009).

Apesar das causas da DCC e da mortalidade das abelhas não serem completamente elucidadas, sabe-se que sua ocorrência é real e que a utilização intensa dos PFSs é um fator chave de mortalidade e desaparecimento das abelhas que, como insetos não-alvo, são afetadas por estes de diversas maneiras (GALLO et al., 2002; PIRES et al., 2016). Os PFSs, além de impactarem na saúde das abelhas, provocando toxicidade aguda e mortalidade, podem interferir na capacidade cognitiva e no comportamento das abelhas (TOSI; NIEH, 2017; JACOB et al., 2019), e isso pode causar problemas na aprendizagem, orientação, coleta de pólen e de néctar (SCHNEIDER et al., 2012; TOSI; NIEH, 2017). Além disso, pode aumentar a suscetibilidade à infecção por patógenos nas colônias de abelhas que tiveram contato com esses produtos porque alguns produtos podem afetar a capacidade imunológica desses insetos (BRANDT et al., 2016; RAYMANN et al., 2018).

2.6 CONTROLE BIOLÓGICO E *APIS MELLIFERA*

O controle biológico é utilizado para o manejo de insetos, doenças e plantas daninhas usando inimigos naturais, ou seja, é uma maneira natural que tem como função regular populações de insetos, doenças e plantas daninhas (GALLO et al., 2002; BARRATT et al., 2017). Esses inimigos naturais podem ser entomófagos, como predadores ou parasitoides, ou entomopatógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides (VAN LENTEREN et al., 2017).

O controle biológico tem sido usado há milhares de anos, o primeiro relato do uso do controle biológico de pragas ocorreu na China, em 1200 a.C. Neste local,

havia lavouras de citros e, entre as árvores, haviam bambus, os quais possibilitavam o acesso de formigas do gênero *Crematogaster*, as quais diminuíam o ataque de lagartas desfolhadoras dos citros (ERTHAL JUNIOR, 2011). Por volta de 1870, começaram as primeiras tentativas científicas de controlar insetos por meio de entomopatógenos (GALLO et al., 2002), que passaram a ganhar cada vez mais espaço no meio agrícola.

A utilização de controle biológico foi crescendo e ganhando mais o mercado, pelas vantagens na proteção da biodiversidade, na atuação relativamente específica no ecossistema (sem efeito em insetos úteis, como os polinizadores), não deixam resíduos tóxicos nos alimentos, na água e no solo, além de serem mais seguros para a saúde dos aplicadores (GALLO et al., 2002; HAAS-COSTA et al., 2010). Existem, aproximadamente, 350 bioinseticidas à base de entomopatógenos, produzidos, registrados e comercializados no Brasil (PAPA; CELOTO, 2014; AGROFIT, 2021).

2.6.1 Fungos entomopatogênicos

No Brasil, existem diversos fungos entomopatogênicos nativos, e o modo de penetração desses entomopatógenos se dá, geralmente, por contato via tegumento, podendo também penetrar por via oral, ou anal em alguns poucos casos. No processo de infecção, primeiramente os fungos aderem, através de seus conídios, à cutícula do inseto, onde formam um tubo germinativo e, em seguida, penetram através do tegumento. Se as condições (temperatura, umidade, pH, oxigênio e nutrição) forem favoráveis, o esporo/conídio germina, penetra no corpo do inseto, colonizando-o, produzindo toxinas e se reproduzindo, levando o inseto à morte (ALVES, 1998; FARIA; MAGALHÃES, 2001; GALLO et al., 2002).

Os insetos que forem parasitados pelos fungos podem apresentar algumas manchas escuras pelo corpo, podendo ter mudança na coloração, principalmente na fase de esporulação do fungo, redução da alimentação, perda da coordenação

motora, desorientação e, então, o inseto passa a ter uma coloração esbranquiçada (entre 72 a 120 horas após a infecção). Isso significa que o fungo já está em fase de esporulação para novas infecções, emitindo hifas externamente ao corpo do inseto (ALVES, 1998).

Quando testados produtos à base de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (1883) sobre abelhas *A. mellifera*, ocorreu redução na sobrevivência apenas quando pulverizados sobre as abelhas (POTRICH et al., 2018).

Três cepas do fungo *Beauveria bassiana* Bassi (1835), resultaram em mortalidade de abelhas *A. mellifera* em laboratório, sendo a estirpe comercial GHA a mais virulenta, causando, aproximadamente, 80% de mortalidade (JAMES et al., 2012). Desta forma, deve-se realizar experimentos em campo para determinar a melhor forma de uso e os riscos desses agentes para os polinizadores, o que nos permite delinear estratégias de uso e inserção destes agentes no MIP. *Beauveria bassiana* reduz a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizada quando misturado ao alimento ou quando pulverizado sobre estas e sobre diversas superfícies que, posteriormente, foram postas em contato com as abelhas (POTRICH et al., 2028).

Testes de laboratório para avaliar a virulência de *Isaria fumosorosea* (NOFLY® WP) sobre abelhas operárias adultas de *A. mellifera*, resultaram em 100% de mortalidade 24 horas após a exposição oral e do contato com o produto (LARA; FERNÁNDEZ, 2014).

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Clonostachys rosea* causaram significativa mortalidade ao ácaro *Varroa*, parasita da abelha, porém, *B. bassiana* e *C. rosea* também causaram mortalidade às abelhas (HAMIDUZZAMAN et al., 2012).

O controle biológico com o uso dos fungos entomopatogênicos pode ser uma saída para substituir a utilização de PFSs, porém, sua inocuidade a organismos não-alvo precisa ser testada (ALVES, 1998). Para *A. mellifera*, a avaliação deveria ser feita em diferentes fases de desenvolvimento do inseto, e para cada novo produto registrado.

2.6.2 Fungos do gênero *Trichoderma*

Diferente dos fungos entomopatogênicos, os fungos do gênero *Trichoderma* são utilizados para controlar outros fungos de solo, causadores de doenças em plantas onde eles atuarão no controle dos patógenos de plantas por competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência (LUCON, 2015).

Biofungicidas à base de *Trichoderma* utilizados para o controle de patógenos vegetais foram investigados em relação à abelha *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), importantes polinizadores na agricultura e horticultura. Os testes laboratoriais mostraram que os produtos à base do fungo não causaram a mortalidade das abelhas e nem afetaram a reprodução, além disso, quando testados sobre as larvas das abelhas (terceiro e quarto ínstares), também não mostraram efeitos patogênicos (MOMMAERTS et al., 2008).

2.7 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (OGMs)

As OGMs são vistas como uma alternativa ao controle químico de insetos. Nestas plantas, foi feita a inserção de genes em seu genoma fazendo com que expressem proteínas/toxinas para o combate a pragas ou resistência a doenças e tolerância a herbicidas, por exemplo (SOARES; TANWIR; GROSSER; DUTT, 2020). No caso de controle de insetos-praga, os OGMs geralmente expressam proteínas Cry, entre outras, as quais são sintetizadas a partir da inserção de um gene da bactéria *B. thuringiensis* (Bt). Quando ingerida pelo inseto, a pro toxina produzida na planta, como uma expressão de gene inserido, vai se tornar uma toxina que se liga às células das microvilosidades do intestino médio do inseto, provocando a lise e ruptura do intestino e isso provocará a entrada de bactérias presentes no intestino, causando uma septicemia no inseto, levando-o à morte (JENKINS et al., 1999; ZHU et al., 2021)

Quando avaliado o efeito do pólen produzido por uma planta de milho OGM

que expressa toxinas de Bt, Cry1F, sobre colônias de abelhas *A. mellifera*, observaram-se impactos subletais em análises de curto prazo (30 dias). Isso acabou diminuindo o comportamento higiênico das colônias e, conseqüentemente, aumentou a quantidade de ácaro *V. destructor*, porém, nas condições avaliadas, não houve aparente diminuição de desenvolvimento da colônia (BIZZOCCHI, 2014).

Considerando a crescente utilização de OGMs que expressam proteínas para o controle de insetos-praga, e que ainda são poucos os estudos avaliando o efeito do pólen destas plantas sobre insetos não-alvo, especialmente polinizadores, os quais podem ser afetados de forma direta e indireta, há a necessidade de se conhecer os efeitos letais e subletais sobre insetos polinizadores.

3 CAPÍTULO A: SELETIVIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

3.1 INTRODUÇÃO

O clima tropical e as condições climáticas no Brasil são favoráveis para o cultivo de diversas *commodities*, aumentando a cada ano a exportação dos produtos aqui produzidos e tornando o país um grande exportador agrícola (FAO, 2019). Com o aumento da exportação, conseqüentemente houve um aumento da produtividade e passou-se a utilizar cada vez mais produtos químicos sintéticos para o controle de pragas e doenças nas lavouras (ANDRADE; MELLO; BESKOW, 2013; VIVEKANANDHAN et al., 2020).

Apesar dos produtos químicos sintéticos apresentarem bons resultados, o uso excessivo na agricultura vem selecionando insetos-praga resistentes. Além disso, verificaram-se efeitos negativos e riscos a saúde humana e ao ambiente, causados por estes produtos. Sendo assim, o uso de produtos biológicos para o controle de pragas e doenças voltou a ganhar força e visibilidade no mercado (FONTES et al., 2020).

Os fungos entomopatogênicos são causadores de doenças em insetos nos ecossistemas naturais e por isso são muito utilizados na agricultura no controle de diversas pragas, pois atacam diferentes grupos de insetos. Desta forma, é mais difícil ocorrer a seleção de populações de insetos resistentes (ALVES, 1998; ERTHAL JUNIOR, 2011; LI et al., 2020). Como são considerados generalistas, também podem provocar a mortalidade de insetos benéficos, como os agentes de controle natural e também de abelhas, que formam um grupo muito diverso e vulnerável quanto a exposição a certos agentes de controle (REINALDO et al., 2019). Por isso se torna importante testar a seletividade de produtos à base de fungos entomopatogênicos, utilizados para o controle de pragas, a insetos não-alvos, como as abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).

A presença das abelhas nas culturas aumenta a produtividade e,

consequentemente, a rentabilidade do produtor (DUFOR; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2020), porém nos últimos anos vem se notando redução do número de colônias de abelhas, sendo que o seu desaparecimento pode estar relacionado aos produtos que são utilizados na agricultura, que não têm o objetivo de afetá-las, mas acabam causando impacto nesse grupo de insetos polinizadores (HRISTOV; SHUMKOVA; PALOVA; NEOV, 2020).

Fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* podem reduzir a sobrevivência de *A. mellifera* africanizada (POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2019). No mercado existem diferentes produtos à base desses fungos, e todos precisam ser testados quanto à seletividade, pois são cepas diferentes e podem ter adjuvantes diferentes em sua composição. Além disso, precisa-se avaliar a aspectos comportamentais. As abelhas são insetos sociais que realizam o forrageamento para buscar alimento, e quando esses produtos afetam a capacidade de voo ou de deslocamento das abelhas, esses insetos podem ter dificuldade no forrageamento, ou até mesmo não conseguirem voltar para sua colônia de origem.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de produtos biológicos comerciais, à base de fungos, sobre a longevidade e o comportamento de deslocamento de abelhas africanizadas *A. mellifera*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Obtenção das abelhas e dos produtos comerciais

No apiário experimental UNEPE – Apicultura (Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Dois Vizinhos*, foram selecionados quadros contendo ovos de um dia, os quais estavam alojados em colmeias tipo Langstroth de 5/10 quadros, escolhidas de maneira

aleatória. Após 18 dias, esses quadros foram embalados em papel kraft (gramatura 50), lacrados com fita e perfurados (pequenos orifícios feitos com agulha), e levados até o Laboratório de Controle Biológico, onde foram mantidos por dois e três dias em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$ fotoperíodo de 12 horas) para emergência uniforme das abelhas operárias utilizadas no experimento.

Os produtos biológicos comerciais utilizados estão descritos na Tabela 3.1. Para cada produto foram preparados 1.000 mL de calda, que foi homogeneizada constantemente.

Tabela 3.1: Produto comercial, agente de controle, formulação, dose recomendada pelo fabricante

AGENTE DE CONTROLE	PRODUTO COMERCIAL	FORMULAÇÃO	DOSE*
<i>Beauveria bassiana</i>	Bouveril PL63	Pó Molhável (WP)	500 a 750 g p.c./ha; 400 L de calda/ha*
<i>Isaria fumosorosea</i>	Challenger	Suspensão Concentrada (SC)	1000 a 1500 mL p.c./ha; 150 a 250 L de calda/ha*
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metarril E9	Pó Molhável (WP)	500 a 750 g p.c./ha; 250 L de calda/ha*
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trichodermil 1306	Suspensão Concentrada (SC)	0,5 a 1 L p.c./ha; 80 L de calda/ha*

* Dosagem recomendada pelo fabricante em culturas polinizadas por abelhas (100%).

Fonte: AGROFIT, 2021.

3.1.2 Bioensaios de ingestão, aplicação tópica, contato e residual

Foram realizados três bioensaios para avaliar a longevidade das abelhas, utilizando a dose recomendada pelo fabricante e um bioensaio de efeito residual.

3.1.2.1 Bioensaio 1: Ingestão dos produtos incorporados à dieta

As abelhas que tinham de 24 a 48 horas de vida, foram anestesiadas com CO₂ por até 120 segundos e, aleatoriamente, foram colocadas 20 abelhas em gaiolas de policloreto de vinila (PVC) (15 cm de altura × 10 cm de Ø), sendo, posteriormente, cobertos com tecido *voil* (metodologia adaptada de BRIGHENTI et al., 2007; COLOMBO et al., 2020). Cada grupo de 20 operárias foi considerado uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento. Para cada repetição foi fornecido algodão embebido em água e pasta Cândi, misturando-se 50 g de açúcar de confeitiro com 10 mL de mel puro, até formar uma massa homogênea e adicionado 1mL da suspensão contendo os produtos (metodologia adaptada de CARVALHO et al. 2009; POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2019) incorporados na dose recomendada pelo fabricante (Tabela 1). Para o tratamento controle foi fornecido apenas o alimento (pasta Cândi).

O bioensaio foi mantido em sala climatizada (27 ± 2°C, U.R. de 60 ± 5%, fotoperíodo de 12 horas) e a mortalidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72, 96, 120 e 144 horas após a ingestão do alimento com os agentes de controle. Durante todo o experimento, as abelhas ficaram com o alimento misturado no produto (metodologia adaptada de BAPTISTA et al., 2009; POTRICH et al., 2018).

Para confirmação da mortalidade das abelhas operárias pelo patógeno, as abelhas mortas foram esterilizadas superficialmente através de passagem em hipoclorito de sódio a 0,5% (10 segundos) e, posteriormente, em água destilada esterilizada (10 segundos, por 3 vezes). Em seguida foram alocadas em câmara úmida esterilizada e armazenados em câmara climatizada, nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.1.2.2 Bioensaio 2: Aplicação tópica dos produtos por pulverização

As abelhas operárias adultas, foram anestesiadas com CO₂, por até 120 segundos. Grupos de 10 indivíduos foram colocados em placas de Petri de vidro, com 15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura. Foram pulverizados 290 µL das

suspensões sobre as abelhas utilizando torre de Potter. O controle foi composto da pulverização de água destilada esterilizada. Após a pulverização, as operárias foram transferidas para gaiolas de PVC (15 cm de altura × 10 cm de Ø) sendo, posteriormente, cobertas com tecido *voil* (metodologia adaptada de BRIGHENTI et al., 2007). Cada gaiola com 20 abelhas foi considerada uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento. Foi oferecida pasta Cândi como fonte de alimento e algodão embebido em água destilada. As condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no bioensaio 1.

3.1.2.3 Bioensaio 3: Contato em superfície tratada com os produtos

Placas de Petri de vidro (15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), foram tratadas via pulverização, internamente, com as suspensões dos produtos, nas mesmas concentrações utilizadas nos bioensaios anteriores (Tabela 1), numa quantidade proporcional à área da placa (290 µL), sendo que apenas na base inferior da mesma, cobrindo toda a superfície onde as abelhas posteriormente caminhariam. Para isso, foi utilizado aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante (1,2 kgf/cm²). Em seguida as placas foram alocadas em câmara de fluxo laminar para secagem (POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2019). O controle foi composto por pulverização de água destilada esterilizada.

Após a secagem das placas, as abelhas foram anestesiadas com CO₂, por até 120 segundos, e colocadas em grupos de 10 indivíduos por placa, onde permaneceram por duas horas em contato com a superfície. Após esse período, as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura × 10 cm de Ø) (duas placas, ou seja, 20 abelhas por gaiola), sendo posteriormente cobertas com tecido *voil* (POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2019) onde receberam algodão embebido em água destilada e pasta Cândi. As condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no bioensaio 1. Para esse bioensaio, foram realizadas 3 repetições extras, para utilização das abelhas nos bioensaios de caminhamento.

3.1.2.4 Efeito residual dos produtos em superfície tratada

Os produtos que provocaram maior mortalidade nas operárias de *A. mellifera*, no bioensaio 3, (*B. bassiana* e *I. fumosorosea*), foram testados quanto ao efeito residual/persistência em superfície tratada. Para isso utilizou-se a mesma metodologia descrita no bioensaio 3. Foram utilizados os produtos nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Tabela 1). As operárias foram colocadas em contato, por duas horas, com as superfícies (placas) tratadas, zero, três e seis dias após o tratamento da superfície. Todas as placas de cada tratamento foram tratadas (via pulverização) na mesma data e estas permaneceram em condições de temperatura, luminosidade, e umidade controladas em sala climatizada ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$, fotoperíodo de 12 horas) até serem utilizadas no experimento para contato com as abelhas. As placas do dia zero foram feitas logo após o tratamento e secagem das placas (como descrito no item anterior).

Após a exposição das abelhas nos diferentes tempos, as condições de manutenção e avaliação das abelhas foram as mesmas descritas no bioensaio 1.

3.1.3 Deslocamento vertical

Após 24 horas da realização do bioensaio de contato em superfície tratada com os produtos (3.2.2.3) e as abelhas do tratamento controle, foram selecionadas ao acaso 20 abelhas de cada tratamento para realizar o teste de deslocamento vertical e queda livre. Este experimento foi realizado em uma sala escura, com uma torre de voo [(35 cm x 35 cm X 105cm (altura)], contendo uma fonte luminosa na base superior e uma fita métrica interna. A torre contém cinco níveis/estratos, conforme metodologia de Tomé et al. (2015), descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Níveis (estratos) de acordo com teste de deslocamento vertical e de queda livre de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).

ESTRATO	ALTURA (cm) DESLOCAMENTO VERTICAL	ALTURA (cm) QUEDA LIVRE
I	Não ocorrência de deslocamento vertical	Queda direta na base da torre
II	1 à 35	1 à 35
III	35 à 70	35 à 70
IV	70 à 105	70 à 105
V	Fonte de luz	Não há queda (direto na luz)

Para análise do deslocamento vertical, as abelhas, no total de 10 por tratamento, foram liberadas, uma a uma na base da torre, e por um minuto avaliou-se o seu comportamento, marcando a altura do estrato máximo atingido. Para a avaliação da queda livre ou retomada de voo, as abelhas foram liberadas na região superior da torre (base V), uma a uma e verificou-se em qual dos estratos a retomada do voo ocorreu.

3.1.4 Movimentação de *A. mellifera* após contato com os produtos biológicos

Depois de 24 horas da realização dos bioensaios de contato com superfície vítrea, 14 abelhas de cada tratamento (tratadas e controle), aleatoriamente, foram submetidas aos testes de caminhada. Para isto, cada abelha foi inserida em uma placa de Petri (15 cm Ø X 1,5 cm) esterilizada, que foi acondicionada na base de um suporte universal, onde foi acoplado um sistema de captura de vídeo. O experimento foi conduzido em sala a temperatura ambiente, com média 26°C. Foi registrado o caminhada/comportamento das abelhas durante 11 minutos, sendo descartado o minuto inicial, por ser considerado o tempo de adaptação.

Foram avaliados com auxílio do software Beemove (o qual está em fase de registro): distância percorrida, tempo de caminhada, tempo de descanso e velocidade de caminhada. O delineamento foi inteiramente casualizado, na qual cada placa foi considerada uma repetição. O software Beemove extraiu e registrou

os parâmetros de interesse, automaticamente, para posterior análise estatística (metodologia adaptada de Libardoni et al, 2021).

3.1.5 Análises estatísticas

Os dados de longevidade das operárias de *A. mellifera* foram submetidos à análise de sobrevivência usando Kaplan-Meier. Os tratamentos foram comparados usando o teste de log-rank e a análise completa foi realizada utilizando o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do software R (R CORE TEAM, 2019).

Na análise do caminhamento das abelhas foi utilizado teste de comparação de médias (Tukey), com o software R, para verificar se houve ou não diferença entre os tratamentos para p-valor <0,05. Para o Bioensaio de deslocamento vertical (voo e queda) foram utilizados Modelos Lineares Generalizados, regressão ordinal, através do teste de teste de Wald (qui-quadrado), utilizando-se o software R, pacote ordinal.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Sobrevivência

3.3.1.1 . Bioensaio 1: Ingestão dos produtos incorporados a dieta

As abelhas operárias de *A. mellifera* oriundas dos tratamentos T2 (*B. bassiana*), T3 (*I. fumosorosea*) e T4 (*M. anisopliae*) tiveram uma redução na sobrevivência, sendo que ao final das 168 horas (sete dias), havia 39, 58 e 51% de abelhas vivas nestes tratamentos, respectivamente. Enquanto as abelhas do grupo controle apresentaram 64%, e o tratamento T5 (*T. harzianum*) 79% de abelhas vivas (Figura 3.1).

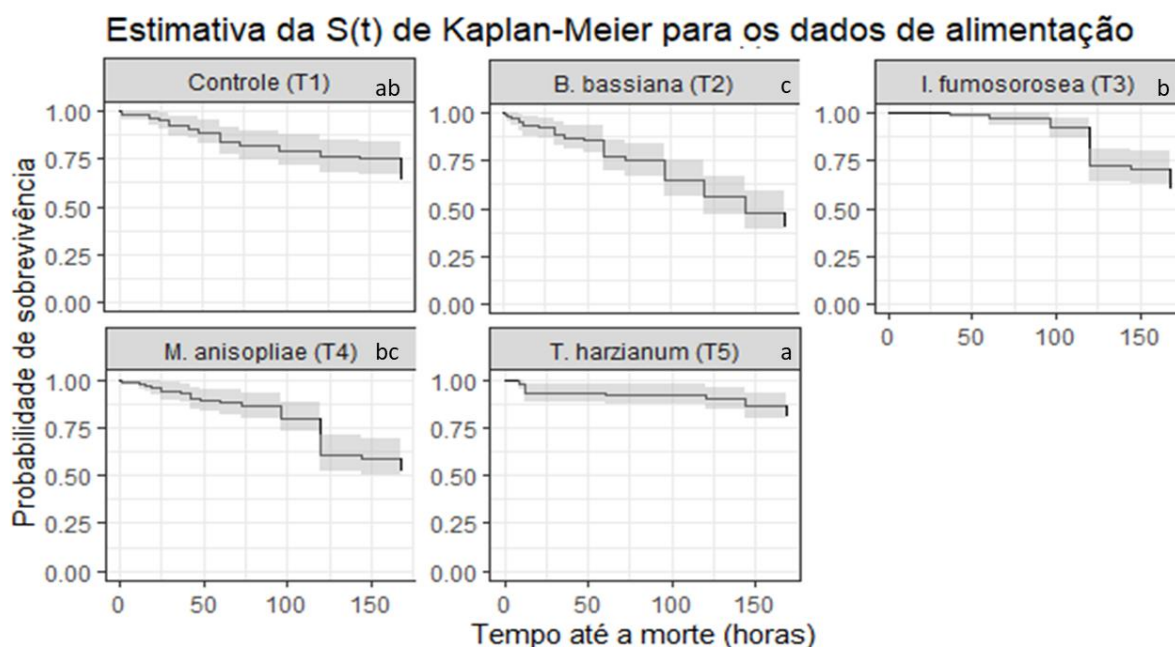


Figura 3.1. Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera*. Após ingestão dos produtos incorporados à dieta. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank.

3.3.1.2 Bioensaio 2: Aplicação tópica dos produtos por pulverização

Para esse bioensaio, o produto à base do fungo *I. fumosorosea* (T3) provocou redução na sobrevivência das abelhas, quando comparado aos outros tratamentos, sendo que ao final das 168 horas (sete dias), apenas 5% das abelhas estavam vivas. O tratamento à base de *M. anisopliae* (T4) também reduziu a sobrevivência, tendo apenas 52% de abelhas vivas ao final das 168 horas. Os outros tratamentos não afetaram a sobrevivência das operárias de *A. mellifera*, apresentando em média, 75% das abelhas vivas às 168 horas (Figura 3.2).

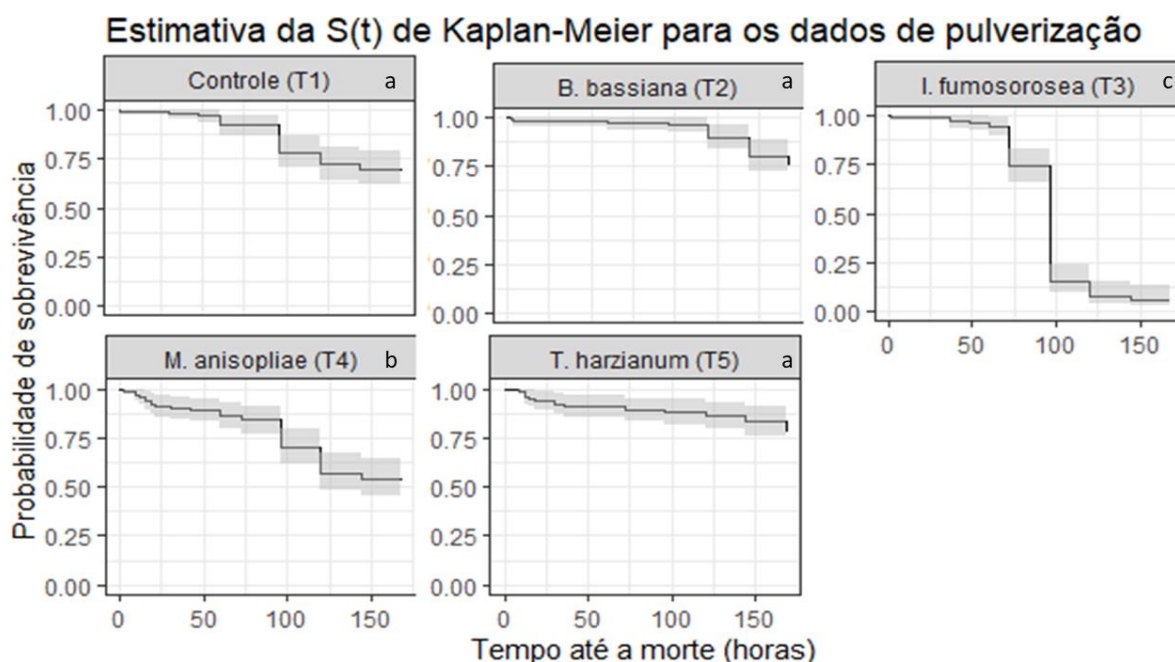


Figura 3.2. Probabilidade de sobrevivência de operárias *Apis mellifera* após aplicação tópica dos produtos biológicos por pulverização. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank.

3.3.1.3 Bioensaio 3: Contato em superfície tratada com os microorganismos

Houve redução na sobrevivência das abelhas operárias de *A. mellifera*, provenientes dos tratamentos T2 (*B. bassiana*) e T3 (*I. fumosorosea*), sendo que ao final das 168 horas (sete dias) haviam 27 e 31% de abelhas vivas nestes tratamentos, respectivamente. Enquanto 63% das abelhas do grupo controle, 50% das abelhas do tratamento T4 (*M. anisopliae*) e 59% das abelhas do tratamento T5 (*T. harzianum*) estavam vivas (Figura 3.3).

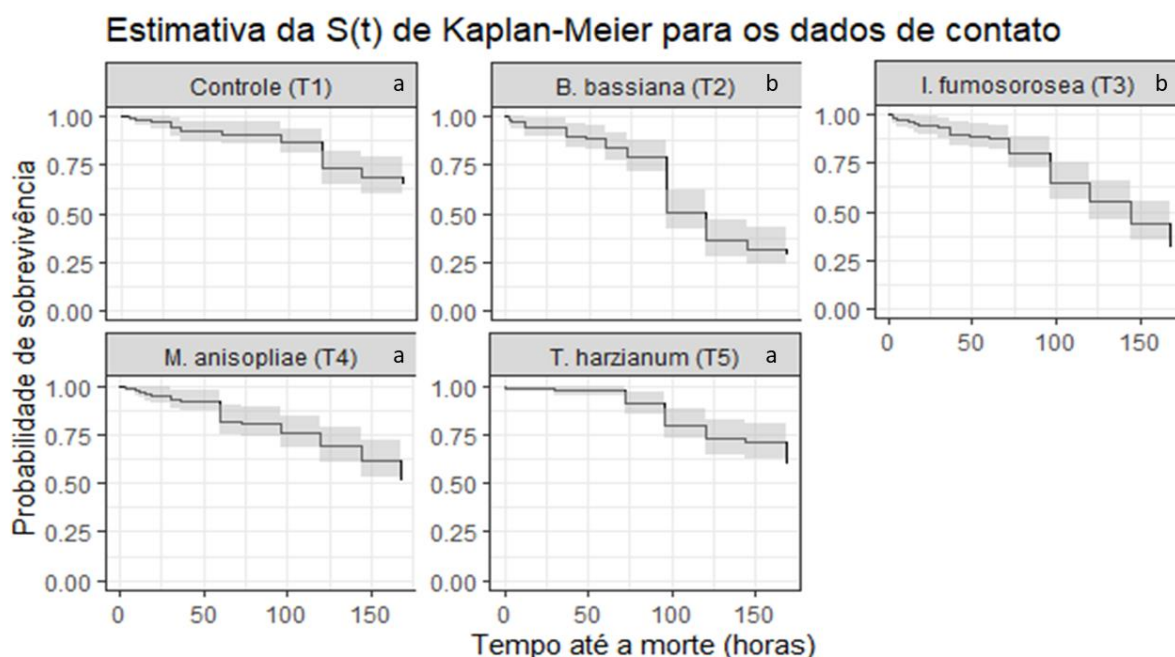


Figura 3.3 Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície tratada com os produtos. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank.

3.3.1.4 Efeito residual dos produtos em superfície tratada

Como os produtos à base de *B. bassiana* (T2) e *I. fumosorosea* (T3) foram menos seletivos às abelhas, e foram utilizados para realizar o teste de efeito residual (Tabela 3.3).

Foi possível verificar que independente do tempo, os produtos continuaram causando efeitos negativos na sobrevivência das abelhas. Ao final das 144 horas de avaliação, em zero dia de aplicação, apenas 16% das abelhas estavam vivas, com três dias 24% e com 6 dias 23% das abelhas tratadas com produto à base de *B. bassiana* estavam vivas (Tabela 3.3).

As abelhas que tiveram contato com o produto a base de *I. fumosorosea* aos zero dias apresentaram 19% vivas, em três dias 25 e 6 dias somente 25%. Enquanto as oriundas do controle de zero dias tinha 65%, três dias 59% e 6 dias 63% (Tabela 3.3).

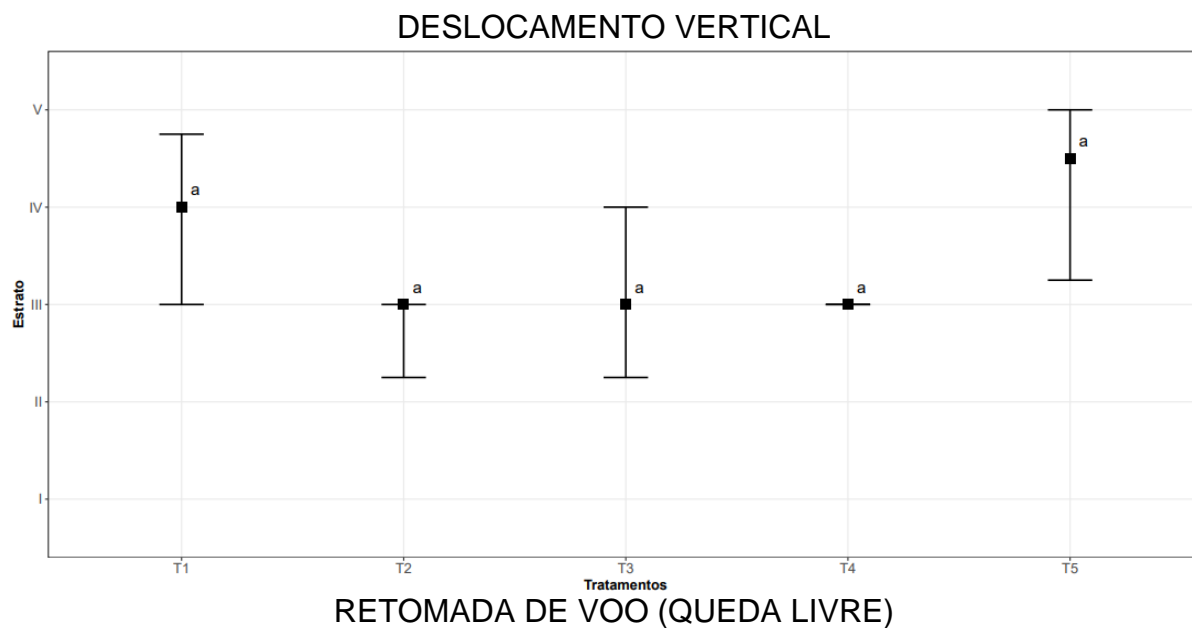
Tabela 3.3. Sobrevivência (%) de operárias de *Apis mellifera*, em contato com residual dos produtos biológicos em superfície tratada.

	0 dias	3 dias	6 dias
Controle	65%Aa	59%Aa	63%Aa
<i>B. bassiana</i>	16%Ab	24%Ab	23%Ab
<i>I. fumosorosea</i>	19%Ab	25%Ab	25%Ab

Letras maiúsculas iguais nas linhas, não diferem entre si. Letras minúsculas iguais nas colunas, não diferem entre ($p < 0,05$)

3.3.2 . Deslocamento vertical

O deslocamento vertical não diferiu das abelhas que entraram em contato com a superfície tratada com os produtos biológicos em relação às do controle (Figura 3.4). Já no teste de retomada de vôo (queda livre), todos os tratamentos diferiram das abelhas do tratamento controle (Figura 3.4).



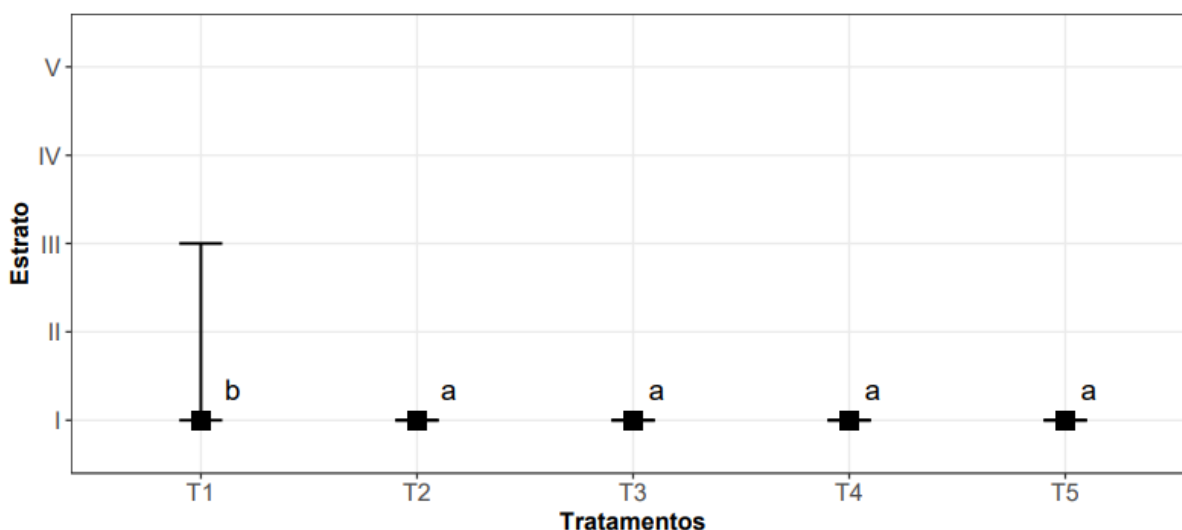


Figura 3.4. Deslocamento vertical (voo vertical e queda livre) de abelhas operárias de *Apis mellifera*, após contato, com superfície tratada com os produtos biológicos. T1 (Controle); T2 (*B. bassiana*); T3 (*I. fumosorosea*); T4 (*M. anisopliae*) e T5 (*T. harzianum*). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3.3 Movimentação de *A. mellifera* após contato com os produtos biológicos

As abelhas oriundas do controle (T1) apresentaram maior velocidade média (13.1 mm/s) de deslocamento, não diferindo das abelhas oriundas do tratamento *M. anisopliae* (T4) e *T. harzianum* (T5). As abelhas que entraram em contato com *B. bassiana* (T2) e *I. fumosorosea* (T3) apresentaram menor velocidade média, com 8.5 e 9.3mm/s, respectivamente de velocidade de caminhada, diferindo do controle (Tabela 3.4 e Figura 3.5).

Tabela 3.4. Velocidade média (mm/s), distância percorrida (mm), tempo (s) de descanso e tempo (s) de caminhada de abelhas *Apis mellifera*, 24 horas após contato com superfície tratada com os produtos.

Tratamento	Velocidade média \pm EP	Distância percorrida \pm EP	Tempo de descanso \pm EP	Tempo de caminhada \pm EP
Controle (T1)	13,1 \pm 1,0 a	6173,6 \pm 727,7 a	137,7 \pm 28,6 a	462,2 \pm 28,6 a
<i>B. bassiana</i> (T2)	8,5 \pm 0,6 b	3820,2 \pm 459,3 b	159,6 \pm 34,0 a	440,3 \pm 34,0 a

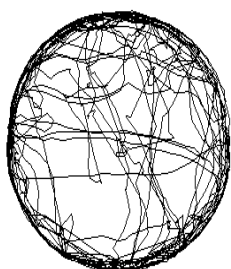
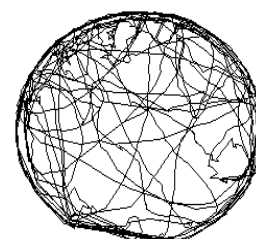
<i>I.</i>				
<i>fumosorosea</i>				
(T3)	9,3 ± 0,5 b	4182,9 ± 319,3 ab	158,1 ± 21,4 a	441,8 ± 21,4 a
M.				
<i>anisopliae</i>				
(T4)	9,9 ± 0,6 ab	4020,1 ± 624,3 b	171,8 ± 25,1 a	428,1 ± 25,1 a
T.				
<i>harzianum</i>				
(T5)	11,6 ± 0,4 ab	5848,0 ± 294,1 a	111,7 ± 15,6 a	488,2 ± 15,6 a

Letras semelhantes, significa que não houve diferença significativa entre os tratamentos (p <0,05).

As abelhas que entraram em contato com *B. bassiana* (T2) e *M. anisopliae* (T4) percorreram as menores distâncias, 3820.2 e 4020.1 mm, respectivamente, diferindo das abelhas do grupo controle (T1), que tiveram distância média percorrida de 6173.6 mm e das abelhas tratadas com *T. harzianum* (T5) com distância média percorrida de 5848.0 mm (Tabela 3.4 e Figura 3.5).

Quanto ao tempo de descanso e tempo de caminhamento não houve diferença entre as abelhas que entraram em contato com os produtos biológicos e as abelhas do grupo controle (T1) (Tabela 3.4).

A - Controle

B – *Beauveria bassiana*C – *Isaria fumosorosea*

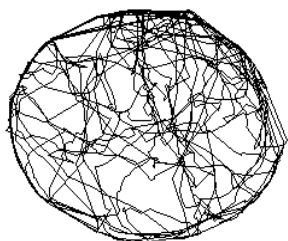
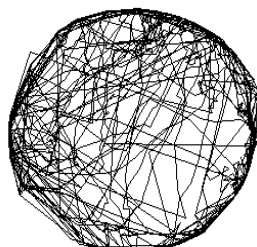
D - *Metarhizium anisopliae***E - *Trichoderma harzianum***

Figura 3.5. Caminhamento por abelhas operárias de *Apis mellifera*, 24 horas após contato com superfície vítrea pulverizada com os produtos à base de fungos.

3.4 DISCUSSÃO

O produto à base de *B. bassiana* quando fornecido às abelhas operárias, incorporado ao alimento e quando as abelhas entraram em contato com superfície vítrea tratada, causou redução de sobrevivência. Esse produto também apresentou efeito residual negativo, com três e seis dias após a aplicação. Também, quando em contato com o produto, as abelhas tiveram uma menor velocidade de caminhamento, ou seja, tiveram seu comportamento alterado.

O fungo *B. bassiana* tem efeito patogênico a insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera. O processo de infecção é dividido em etapas, onde, primeiramente, ocorre a adesão e germinação dos esporos que formarão tubos germinativos, multiplicarão as hifas dentro e fora do corpo do hospedeiro, onde formarão novos esporos que servirão para a próxima etapa da infecção (ALVES, 1998). QUAL A IMPORTANCIA DISSO PRO TRABALHO?

O fungo *B. bassiana* pode causar a redução na longevidade de *A. mellifera* quando pulverizado sobre estas ou quando as operárias entram em contato com superfície tratada com esse fungo (POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2020). Apesar de *B. bassiana*, reduzir a longevidade das abelhas operárias de *A. mellifera*, a análise do intestino médio de operárias por microscopia eletrônica de varredura, não apresenta sinais de ruptura, mantendo-se íntegro (COLOMBO et al., 2019).

Também não afeta os parâmetros morfométricos na produção de rainhas (COLOMBO et al., 2020).

O fungo *B. bassiana* apresenta característica seletiva à invasão pois os esporos geralmente iniciando a infecção em locais como as membranas intersegmentares do abdômen do inseto e o processo de adesão do fungo pode também sofrer interferência de acordo com os constituintes da cutícula do inseto (VALERO-JIMÉNEZ et al., 2016; DING; CHI, 2017).

O produto à base de *I. fumosorosea* quando pulverizado sobre as abelhas, e quando elas entraram em contato com superfície tratada com o produto, provocou redução na sobrevivência. Além disso, o produto causou efeito residual (em três e seis dias) e afetou a velocidade de caminhamento das abelhas que tiveram contato com este fungo. No campo, provavelmente a desativação será maior devido aos raios ultravioletas o que não aconteceu em laboratório por não haver tanta exposição, já que foram colocadas em condições controladas.

O fungo *I. fumosorosea* tem ampla distribuição mundial e apresenta uma gama de hospedeiros, entre várias espécies de Diptera, Hemiptera e outros insetos (ZIMMERMANN, 2008; ZHANG; ZOU; HU, 2016; GANDARILLA-PACHECO et al., 2018) e vem sendo cada vez mais explorado no combate a insetos-pragas nas mais diversas culturas (AGROFIT, 2021). Porém, não foram encontrados na literatura trabalhos onde os autores tenham testado essa espécie de fungo sobre abelhas *A. mellifera*.

Entretanto, as abelhas sem ferrão, *Tetragonisca angustula* Latreille, *Scaptotrigona mexicana* Guérin-Meneville, e *Melipona beecheii* Bennett, expostas ao fungo *I. fumosorosea* (cepa Ifu-lu 0), via pulverização, tiveram baixa mortalidade (TOLEDO-HERNÁNDEZ; RUÍZ-TOLEDO; TOLEDO; SÁNCHEZ, 2016), por serem cepas diferentes ou ainda insetos que tenham comportamentos diferentes das abelhas utilizada neste trabalho.

Este mesmo fungo, isolados (IBCB 367 e IBCB 394), não interferiu nos parâmetros biológicos do parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em laboratório (POTRICH et al., 2020), inseto da mesma ordem da abelha *A. mellifera*.

Dos experimentos realizados neste trabalho, apenas as abelhas do bioensaio de pulverização direta tiveram sua sobrevivência reduzida quando tratadas com o produto a base de *M. anisopliae*.

O fungo *M. anisopliae* infecta uma ampla gama de hospedeiros (hospedeiros generalistas) e a mortalidade das abelhas operárias no bioensaio de pulverização pode estar relacionada com a facilidade de penetração dos conídios do fungo em qualquer parte do corpo dos insetos como via oral, tarsal ou pelo abdômen (ALVES, 1998).

Este fungo tem potencial para reduzir a sobrevivência de abelhas operárias quando pulverizado topicamente ou quando pulverizados em superfície (COLOMBO et al., 2020). O que foi observado no presente trabalho, onde o fungo reduziu a longevidade das abelhas por aplicação tópica e misturado ao alimento.

Podemos levantar a hipótese de que a infecção através da cutícula pode ter causado, na aplicação tópica de *M. anisopliae*, uma menor longevidade das abelhas operárias.

As abelhas tratadas com o produto à base de *T. harzianum*, não apresentaram nenhuma alteração nas avaliações realizadas seguro às abelhas nas condições em que o experimento foi conduzido.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são utilizados na agricultura como biofertilizantes, biopesticidas promotores de crescimento, estimulantes de resistência natural, sendo utilizados para proteger as plantas contra possíveis patógenos ou aumentar o crescimento vegetativo, aumentando assim o crescimento e produtividade das plantas (WOO, et al., 2014; GANUZA et al., 2018). Por isso eles devem ser testados quanto à segurança também sobre organismos não-alvo, como as abelhas.

Trichoderma harzianum não apresenta riscos para as abelhas sem ferrão, *S. mexicana* e *Melipona beecheii*, também para *A. mellifera*, pelo método de pulverização direta (TOLEDO-HERNÁNDEZ et al., 2016), o que corrobora com os resultados apresentados no presente trabalho. *Trichoderma harzianum* (Tricodermil) também foi seletivo para *T. pretiosum* e *Telenomus remus*, Nixon, 1937, insetos da ordem Hymenoptera, não afetando o parasitismo e a emergência de adultos sendo

inofensivo para pupas e adultos (AMARO et al., 2015; AMARO et al., 2018).

De maneira geral, os fungos avaliados no presente estudo não interferiram na capacidade de deslocamento vertical das operárias de *A. mellifera* africanizada, ou seja, não afetaram o voo das abelhas e a retomada deste. Porém, na análise de deslocamento, depois de tratadas, houve diferença, com redução na velocidade média das operárias. Isso pode ter acontecido pelo fato de os conídios terem ficado aderidos no exoesqueleto das abelhas, dificultando o momento de deslocamento e, conseqüentemente, diminuindo a velocidade do caminamento delas. Além disso, as abelhas apresentam o comportamento de limpeza, também conhecido por *grooming*, causando uma diminuição no tempo e velocidade de caminamento.

Além disso, apesar dos produtos utilizados neste trabalho terem causado alguma alteração na longevidade e no deslocamento, esse impacto foi pouco, sendo positivo, principalmente quando comparamos com trabalhos que avaliam efeitos de inseticidas químicos sintéticos. Estes apresentam efeitos negativos tanto na longevidade quanto no comportamento das abelhas (ABATI et al., 2021). E isso acaba interferindo na dinâmica da colônia, bem como na polinização realizada pelas abelhas. Pois elas utilizam o voo e o caminamento para desenvolverem funções como coleta de néctar e pólen.

As diferentes espécies dos fungos assim como as diferentes cepas e concentração de conídios existentes do mesmo fungo podem apresentar diferente virulência causando maior ou menor mortalidade nos insetos (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012; ALCALÁ-GÓMEZ et al., 2017). Frente a isso, destaca-se a importância em testar produtos que estão sendo utilizados nas mais diversas culturas sobre os organismos não-alvo, como as abelhas *A. mellifera*.

Apesar de alguns dos fungos testados terem reduzido a longevidade das abelhas, novos testes em campo podem ser realizados, bem como experimentos sobre larvas e rainhas de *A. mellifera* africanizada. Justifica-se em laboratório, que as abelhas são expostas diretamente aos tratamentos, sendo que em campo essa exposição pode ser reduzida garantindo ainda mais a segurança desses produtos em relação às abelhas *A. mellifera* africanizada.

3.5 CONCLUSÃO

O fungo *T. harzianum* é seletivo, em laboratório, a operárias de *A. mellifera* africanizada, sendo considerado seguro. Os outros fungos (*B. bassiana*, *I. fumosorosea* e *M. anisopliae*) se mostraram menos seletivos nos bioensaios de laboratório a operárias *A. mellifera* africanizada.

4 CAPÍTULO B: O PÓLEN DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO PARA EXPRESSÃO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CAUSA EFEITOS LETAL OU SUBLETAIS EM OPERÁRIAS DE *APIS MELLIFERA* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)?

4.1 INTRODUÇÃO

A expansão da produção de alimentos no mundo teve início com a Revolução Verde, em 1960, com a modernização da agricultura através da incorporação de meios inovadores e tecnológicos (MATOS, 2010). A partir de então, começaram a surgir as plantas geneticamente modificadas (PGMs) com o intuito de sanar alguns problemas que existiam na agricultura, como o aumento do tempo de prateleira de alguns alimentos e em seguida, com os avanços dos estudos, o controle de insetos-praga (HILDER et al., 1987; KAPLAN; WINKLERPRINS, 2017).

As PGM, para o controle de insetos, contribuem para a redução dos impactos em função da menor utilização de inseticidas químicos sintéticos, conseqüentemente, uma diminuição das intoxicações no campo, menor impacto sobre organismos não-alvo, diminuição de resíduos no solo, na água e nos alimentos (HELLMICH et al., 2008; MENDES et al., 2011). Dentre esses OGM, destaca-se o milho, que é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundo com uma produção de 1,1 bilhão de toneladas na safra de 2019/2020, com distintas variedades geneticamente modificadas, as quais expressam diferentes transgenes (USDA, 2020; FAO, 2021; ISAAA, 2021). Os países que possuem a maior demanda da produção de milho, cerca de 65%, são Estados Unidos, China, União Europeia e Brasil, enquanto os principais países exportadores dessa commodity são Estados Unidos, Brasil, Argentina e Ucrânia (FAO, 2021; USDA, 2021). Neste contexto, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (sendo a sua maioria transgênica), possuindo no mercado 64 eventos transgênicos (ISAAA, 2021).

À cada ano, o Brasil passa a utilizar, internamente, mais grãos de milho, tanto na alimentação de animais, quanto nas usinas de etanol, à base de milho, fazendo

com que haja uma expansão significativa na produção desse grão (CONAB, 2019). Porém, o plantio extensivo e prolongado de OMGs pode trazer impactos negativos, como o aumento de pragas secundárias, a redução de parasitoides, predadores e polinizadores (CAPALBO; FONTES, 2004; MENDES et al., 2011).

Existe a preocupação do impacto que esses OGM possam ocasionar na biodiversidade onde está inserido. Neste contexto, várias pesquisas já foram feitas e estão sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar o impacto e a segurança do pólen sobre organismos não-alvos (HAN et al., 2015; TIAN et al., 2017), predadores (MENG et al., 2016; LIU et al., 2021) e abelhas (WANG et al. 2016).

Desta forma, faz-se necessário testar se plantas OGM, que expressam toxinas para o controle de insetos como o milho (milho Bt), impactam a sobrevivência ou comportamento das abelhas, já que estas utilizam do pólen dessas plantas como fonte de alimento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito letal e subletal do pólen de três variedades de milho Bt sobre abelhas operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) africanizada.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das abelhas e do pólen

Foram utilizadas abelhas com 24 a 48 horas de vida e, para tal, foram marcados quadros com ovos de um dia, do apiário experimental da Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura (UNEPE/Apicultura) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Após 19 dias esses quadros contendo crias operculadas, foram retirados das colônias, envoltos em papel kraft, selados e perfurados com agulha, e levados ao Laboratório de Controle Biológico, onde ficaram por dois dias em câmara climatizada ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$, fotofase de 12 horas) até a emergência das abelhas operárias e,

consequentemente, montagem do experimento. Não foi fornecido alimento para as abelhas durante esse período.

O pólen foi coletado de plantas de milho transgênico, sem qualquer tratamento fitossanitário, cultivadas na fazenda experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). O pendão da planta foi envolto por um saco de papel kraft por 24 horas. Após este período, os sacos foram retirados, levados para o Laboratório de Controle Biológico, e o conteúdo peneirado em peneira com malha de 90 micrômetros para a coleta do pólen, o qual foi armazenado em freezer (-4°C) até a utilização. Foi utilizada como controle, apenas alimentação com pasta Cândi (T1), uma variedade de milho orgânico convencional (não-transgênico) (T2) e três variedades de milho transgênico (T3 – MG600PW; T4 – MG580PW e T5 – FÓRMULA).

A linhagem Fórmula, expressa a proteína Cry1AB e as linhagens MG600PW e MG580PW apresentam a tecnologia PowerCore com a expressão das proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2.

4.2.2 Análise de sobrevivência

As abelhas foram anestesiadas com CO₂, por até 120 segundos, e foram colocadas em gaiolas de PVC (15 cm de altura × 10 cm de Ø). Foram mantidas 20 abelhas em jejum por gaiola, durante 2 horas. Vinte operárias por gaiola receberam 1g de pasta Cândi (mistura homogênea de 50 g de açúcar de confeitaria com 10 mL de mel puro) incorporado com 20mg de cada tratamento de pólen (metodologia adaptada de ABREU, 2015). Além disso, foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água, em uma das extremidades da gaiola. Após 24 horas, o alimento contendo pólen foi removido e substituído por pasta Cândi pura, a qual foi renovada diariamente. Cada gaiola foi considerada uma repetição, e foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Foram utilizados dois tratamentos como controle, uma delas sem adição de pólen à pasta Cândi (T1) e a outra com pólen oriundo de cultivar orgânico não transgênico (T2).

O bioensaio foi mantido em sala climatizada ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$ fotofase de 12 horas) e a mortalidade das abelhas foi avaliada com uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72, 96, 120 e 144 horas após a montagem do experimento (LIBARDONI et al., 2021). As abelhas foram contabilizadas como mortas quando recebiam algum estímulo (toque de um pincel com cerdas macias) e não apresentavam nenhuma resposta.

4.2.3 Deslocamento vertical e queda livre

Após as 144 horas do experimento de sobrevivência, foram utilizadas 10 abelhas por tratamento para realizar o teste de deslocamento vertical e 10 abelhas para o teste de queda livre (metodologia adaptada de TOMÉ et al., 2015). O experimento foi realizado em uma sala escura, com uma torre de voo (35 cm x 35 cm de base e 105cm de altura), fechada com tecido tipo *voile*. A torre continha iluminação na parte superior (fonte luminosa de LED) e na parte interna, em toda a altura, tinha uma fita métrica para a medição do ponto de deslocamento. A torre foi dividida em níveis que correspondem a estratos, conforme Tabela 4.1.

Para análise de deslocamento vertical, as abelhas foram colocadas, uma a uma, na base da torre, e, durante 1 minuto, sendo verificado qual estrato máximo foi alcançado por cada operária. Para o teste de queda livre, as abelhas foram colocadas, uma a uma, no estrato superior (V) da torre e foi verificado em qual estrato cada abelha conseguia retomar o voo, conforme a Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Níveis (estratos) de acordo com teste de deslocamento vertical e de queda livre de *Apis mellifera*. (TOMÉ et al. 2015).

ESTRATO	ALTURA (cm)	ALTURA (cm)
	DESLOCAMENTO VERTICAL	QUEDA LIVRE
I	Não ocorrência de deslocamento vertical	Queda direto à base da torre
II	1 a 35	1 a 35
III	35 a 70	35 a 70
IV	70 a 105	70 a 105
V	Fonte de luz	Não há queda (direto na luz)

4.2.4 Efeito das planas geneticamente modificadas sobre o mesêntero das operárias de *A. mellifera*

Após as 144 horas de experimento, foram selecionadas, aleatoriamente, duas abelhas por tratamento, para a dissecação e retirada do mesêntero. Após a dissecação os mesênteros receberam 1 mL de fixador Karnovsky modificado [paraformaldeído 3%, glutaraldeído 3% e tampão fosfato (PO₄ 0,1M)] para preservá-los, e então foram armazenados em geladeira (4°C). As amostras foram analisadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (LMEM-UEL) utilizando o microscópio de varredura (metodologia de COLOMBO et al., 2019).

Inicialmente, foi realizada lavagem em tampão fosfato (3x15 minutos), fixação (tetróxido de ósmio 1% -OsO₄, 1 hora) e lavagem em tampão fosfato (3x15 minutos). Em seguida, o material foi desidratado em álcool (álcool 70%-3x10 minutos, álcool 80%-3x10 minutos, álcool 90%-3x10 minutos e álcool 100%-4x10 minutos). Após esse procedimento, as amostras passaram pelo ponto crítico em CO₂.

Após a desidratação, as amostras foram acondicionadas em suportes metálicos (stubs) contendo cola de prata. As amostras foram então recobertas com ouro, através do equipamento Metalizador BAL-TEC (modelo SCD – 050) e então observadas em alto vácuo e intensidade de feixe de elétrons de 20KV em microscópio eletrônico de varredura, sendo as imagens capturadas através de fotografias digitais, armazenadas em computador e analisadas qualitativamente, comparando os tratamentos.

4.2.5 Análises estatísticas

Para os dados de sobrevivência das operárias de *A. mellifera*, foi realizada

análise de sobrevivência usando Kaplan-Meier. Os tratamentos foram comparados usando o teste de log-rank e a análise completa foi realizada utilizando o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do software R (R CORE TEAM, 2019).

Os dados de deslocamento vertical (voo e queda) foram analisados utilizando modelos lineares generalizados, regressão ordinal, através do teste de teste de Wald (qui-quadrado), utilizando-se o software R, pacote ordinal.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sobrevivência

Ao final das 144 horas de avaliação, verificou-se a sobrevivência de 85% das abelhas oriundas do tratamento controle, somente pasta Cândi (T1), 90% das abelhas oriundas do tratamento controle, pólen de milho não Bt. misturado na pasta Cândi (T2), 82% das abelhas oriundas do T3 (milho Bt MG600PW), 83% do T4 (milho Bt MG580PW) e 85% do T5 (milho Bt FÓRMULA). Não houve diferença na sobrevivência das abelhas alimentadas com os diferentes tipos de pólen (Figura 4.1).

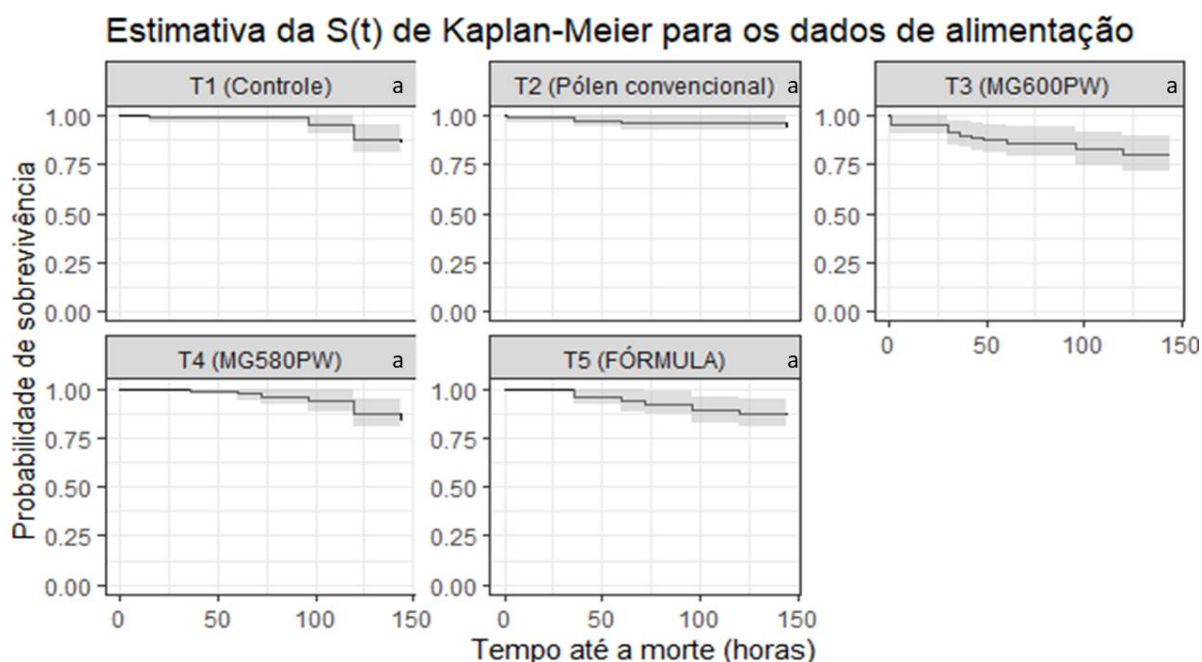


Figura 4.1 – Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera*, por Kaplan-Meier, ajustado ao período (horas) após a alimentação com pasta Cândi contendo os tratamentos.

Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank.

4.3.2 Deslocamento vertical e queda livre

As abelhas operárias de *A. mellifera* não tiveram a capacidade de deslocamento vertical e nem de queda livre (retomada de voo) alteradas quando alimentadas com pólen de milho transgênico, quando comparadas entre si e com os controles (uma com pasta Cândi pura - T1 e a outra com pólen oriundo de cultivar orgânico não transgênico - T2), conforme Figura 4.2.

DESLOCAMENTO VERTICAL

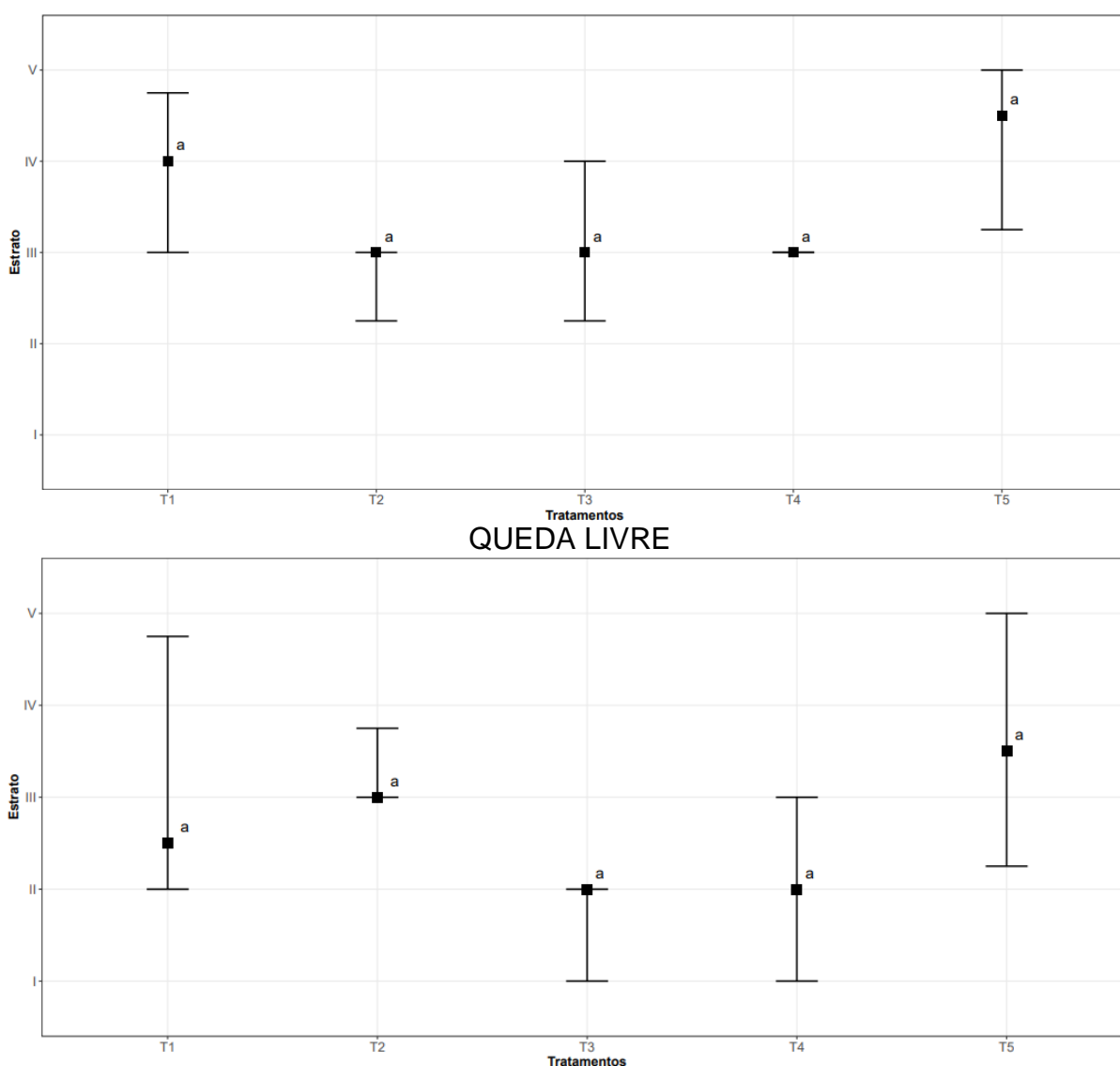


Figura 4.2. Deslocamento vertical (voo vertical e queda livre) de abelhas operárias de *Apis mellifera*, 96h após a alimentação com os diferentes tratamentos, somente pasta Cândi (T1), pólen de milho não Bt. misturado na pasta Cândi (T2), T3 (milho Bt MG600PW), T4 (milho Bt MG580PW) e T5 (milho Bt FÓRMULA). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4.3.3 Alterações do mesêntero das operárias de *A. mellifera*

Após análise qualitativa das imagens, verificou-se que, quando alimentadas com pólen de milho Bt, os tecidos do intestino médio de *A. mellifera* apresentaram algumas alterações morfológicas externas ou internas, rupturas ou danos nos

tecidos (Figura 4.3).

Na Figura 4.3 A (T1 abelhas alimentadas com pasta Cândi pura) é possível verificar o conteúdo do lúmen (cl), a membrana peritrófica em torno de toda região do mesêntero, o epitélio intestinal (es) e por fora, observa-se as fibras musculares (fm) da camada circular (interna) e fibras musculares longitudinais (externa).

Na Figura 4.3 B (T2 – pólen oriundo de cultivar orgânico não transgênico) observa-se as mesmas estruturas descritas em 4.3 A. Porém, a membrana peritrófica, que fica em torno do lúmen revestindo o epitélio está mais espessa quando comparada com a mesma estrutura, presente na figura 4.3 A. Nas Figuras 4.3 C (T3 abelhas alimentadas com pólen de milho MG600PW) e 4.3 D (T4 abelhas alimentadas com pólen de milho MG580PW) observam-se fibras musculares na região externa do mesêntero com características de rompimento (mr), deformações e frouxas (mf) e também musculatura deformada (dm). As abelhas do tratamento com pólen de milho Fórmula (T5) não tiveram alterações estruturais.

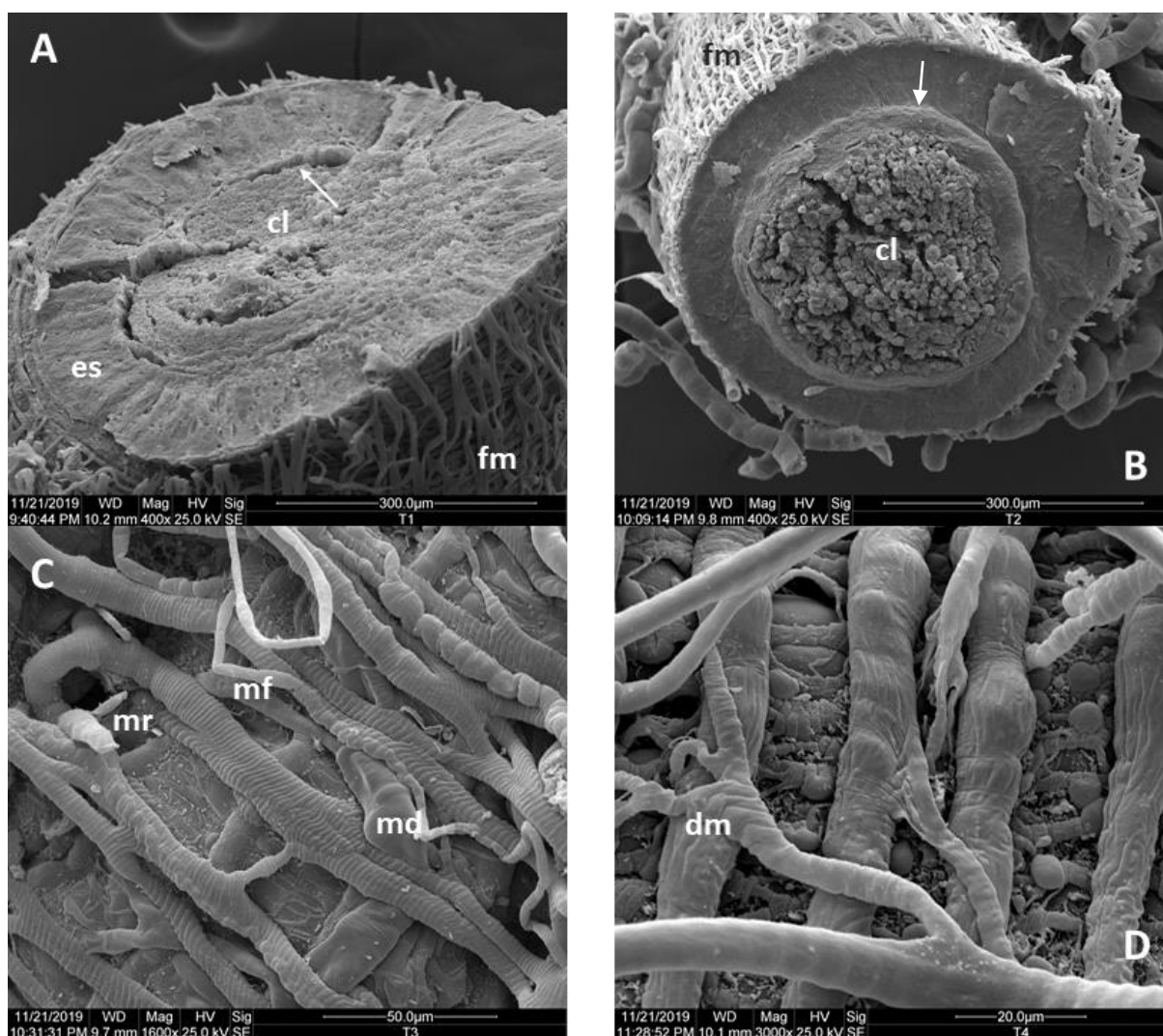


Figura 4.3 Micrografia eletrônica de varredura do intestino médio de operárias de *A. mellifera*, após ingestão da pasta Cândi pura – T1 corte transversal do mesêntero (A). Incorporada com pólen de milho convencional T2 – corte transversal do mesêntero (B). T3; incorporada com pólen de milho MG600PW – superfície externa do mesêntero (C) – T4; pólen de milho MG580PW – superfície externa do mesêntero (D) – T4. cl: conteúdo do lúmen; flecha: membrana peritrófica; es: epitélio simples (uma só camada) prismático (ou colunar ou cilíndrico); fm: Fibras musculares da camada longitudinal (externa) e fibras musculares da camada circular (interna); mr: musculatura rompida; mf: musculatura deformada e frouxa; md: fibra muscular dilatada; dm: musculatura deformada.

4.4 DISCUSSÃO

As linhagens de milho utilizadas nos experimentos foram: Fórmula, a qual expressa a proteína Cry1AB e MG600PW e MG580PW, estes apresentam a tecnologia PowerCore com a expressão das proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2. Essas proteínas ligam-se às células epiteliais do intestino médio das lagartas de Lepidoptera, causando lise coloidosmótica celular, conferindo resistência da cultivar a estes insetos (ISAAA, 2021; UNIPROT, 2021).

A proteína Cry1AB (3 e 5000 ppb) fornecida em xarope não causa efeito letal em abelhas adultas de *A. mellifera* (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008) o que corrobora com o presente estudo. O mesmo foi observado quando fornecido às abelhas pólen do milho Bt que expressa três proteínas Cry Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry3Bb1, o qual não interferiu na taxa de sobrevivência de abelhas *A. mellifera carnica* (HENDRIKSMA et al., 2013).

O pólen de algodão Bt, que expressa as proteínas CryAc+CpTI, não foi letal para operárias adultas de *A. mellifera* (HAN et al., 2010a; HAN et al., 2010b). A toxina Cry1Ah, em 3 concentrações (10 µg/mL, 10 ng/mL e 1 ng/mL), misturada em xarope de açúcar, também não causou redução na sobrevivência das abelhas adultas de *A. mellifera* (DAI et al., 2011).

Apesar de o pólen de milho transgênico não causar efeitos letais, ele pode causar efeitos subletais, como alterações no comportamento devendo essas alterações ser também avaliadas, pois podem afetar por exemplo, o forrageamento das abelhas operárias de *A. mellifera*.

Abelhas, *A. mellifera*, expostas a 5000 ppb de xarope contendo a proteína Cry1AB tiveram o desempenho de aprendizagem olfativa alterado em testes de reflexo de extensão de probóscide, o que pode refletir em prejuízo no processo de forrageamento (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008). Já a toxina Cry1Ah, em três concentrações (10 µg/mL, 10 ng/mL e 1 ng/mL) não interferiu na massa da glândula hipofaringeana de abelhas *A. mellifera ligustica* e *Apis cerana cerana*, (DAI et al., 2011), sendo essa glândula de importância na produção da fase proteica da geleia real.

O pólen do milho que expressa três proteínas Cry Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry3Bb1 não alterou o tamanho da população bacteriana do intestino médio (de abelhas adultas de *A. mellifera*) e taxa de digestão do pólen em comparação com variedades de milho convencional (HENDRIKSMA et al., 2013). Assim, como não foram encontradas diferenças na estrutura do intestino médio das abelhas alimentadas com os diferentes tipos de pólen no presente trabalho..

O pólen de algodão Bt, que expressa as proteínas CryAc+CpTI, provocou efeito anti-alimentar, pois causou redução na quantidade de alimento consumida por *A. mellifera* (HAN et al., 2010a; HAN et al., 2010b). Estes efeitos subletais podem estar associados à presença da proteína Cry, que está no pólen dos milhos Bt. Esta proteína liga-se à parede do mesêntero, podendo romper as células fazendo com que cesse a alimentação (HOFTE; WHITELEY, 1989).

Poucos estudos são encontrados na literatura que avalie o mesêntero de abelhas alimentadas com pólen transgênico através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), porém existem alguns estudos que avaliam a ação da bactéria *Bacillus thuringiensis*, a qual produz os cristais que estão presentes de maneira semelhante na tecnologia do milho Bt.

Quando incorporado um produto comercial à base de *B. thuringiensis*, na concentração de 0,5 g do produto.100 mL⁻¹ de água destilada esterilizada, no alimento fornecido a abelhas operárias de *A. mellifera*, não foram verificadas alterações morfológicas externas ou internas nos tecidos do mesêntero dessas abelhas pela MEV (COLOMBO et al., 2019). Porém, no presente trabalho as abelhas alimentadas com o pólen de MG600PW (T3) e MG580PW (T4) tiveram as fibras musculares da região externa do mesêntero com algumas deformações, que podem ter sido causadas pelos tratamentos, pois as proteínas Cry podem gerar alterações fisiológicas agindo diretamente nas atividades enzimáticas (RENZI et al., 2016) podendo alterar e deformar essas estruturas.

Entretanto uma única exposição aguda a um biopesticida, contendo *B. thuringiensis* (Bt), em análise de MEV, 96 horas após o tratamento, causou irregularidade no perfil do epitélio em algumas áreas do mesêntero, além de numerosos fragmentos celulares irregulares de diferentes tamanhos foram

intercalados com as fibrilas da membrana peritrófica, as quais, devido a isso, não cobriam uniformemente a superfície do epitélio (D'URSO et al., 2016). O que pode levar a deformações e frouxidão nas fibras musculares do mesêntero.

Por meio de microscopia de luz, observou-se que abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, alimentadas com três cepas diferentes de *B. thuringiensis*, tiveram o mesêntero desintegrado, com células sem forma em comparação com as células das operárias do controle. Além disso, as criptas das células do mesêntero das abelhas alimentadas com Bt foram desestruturadas e desorganizadas, mostrando que as proteínas Cry causam danos estruturais e morfológicos no mesêntero das abelhas alimentadas com as diferentes cepas da bactéria *B. thuringiensis* (LIBARDONI et al., 2018).

Abelhas operárias africanizadas de *A. mellifera* alimentadas com produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*, não tiveram a sobrevivência e o comportamento, alterados (por meio do teste de caminhamento), mostrando que não houve efeitos letais ou subletais sobre as abelhas (LIBARDONI et al., 2021).

Resultados como os encontrados no presente trabalho, onde não houve efeito letal e/ou subletal, como na capacidade de voo e queda das abelhas adultas de *A. mellifera* em condições de laboratório, podem mostrar que a campo esses efeitos, caso existam, são ainda menores. Porém, efeitos a longo prazo devem ser estudados, pois a cada ano, maior é a área de plantio de culturas geneticamente modificadas (Bt) bem como novas linhagens, que a longo prazo podem trazer prejuízos às colônias de abelhas.

4.5 CONCLUSÃO

O pólen das linhagens de milho transgênico (Bt) Fórmula (Cry1AB), MG600PW (Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) e MG580PW (Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), incorporado na pasta de Cândi, não causa efeitos letais às abelhas africanizadas de *A. mellifera*. Porém, o pólen de milho Bt, MG600PW e MG580PW causa alterações nas fibras musculares externas do intestino médio, quando ingerido

pelas abelhas.

5 CAPÍTULO C: EFEITOS LETAL, SUBLETAIS E RESIDUAL DE ENGEO PLENO® SOBRE *APIS MELLIFERA* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

5.1 INTRODUÇÃO

As abelhas são responsáveis pela produção de mel, geleia real, própolis, cera e apitoxina, dentre outros produtos (COSTA-MAIA et al., 2010). São os mais importantes organismos polinizadores, contribuindo para aumentar o rendimento e a qualidade de sementes e grãos em ambientes agrícolas, aumentando o tamanho, peso, qualidade (volume do suco, teor de açúcar) e número de frutos, além de reduzir as deformidades e permitir o amadurecimento uniforme destes (COSTA-MAIA et al., 2010; POTTS et al., 2010; SANFORD 2011; CALDERONE 2012; GIANNINI et al., 2015; IPBES, 2016). Assim, esses insetos garantem o equilíbrio e a manutenção dos sistemas de cultivo, além de proporcionar aumento da produção mesmo em plantas autógamas, como na cultura da soja (*Glycine max*) que, quando polinizada por abelhas, apresenta um aumento de até 37% na produtividade, em comparação com a soja não polinizada (CHIARI et al., 2008). A polinização realizada pelos insetos, traz para as principais safras no mundo um rendimento entre 200 a 400 milhões de dólares por ano (TSCHARNTKE, 2021).

Porém, com a intensificação da produção agrícola, principalmente devido ao aumento do uso de inseticidas químicos sintéticos, surgiram os primeiros relatos de diminuição das populações de abelhas (GRIXTI et al., 2009). No entanto, as pesquisas relacionando os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas foram intensificadas apenas a partir do ano de 2006, devido aos primeiros relatos de desordem de colapso das colônias (DCC) (ABATI et al., 2021). A DCC é caracterizada pelo desaparecimento de abelhas, sem a presença de abelhas mortas nas proximidades das colônias (KAPLAN, 2012; VANENGELSDORP et al., 2017). Além disso, outro caso recorrente nos últimos anos é a mortalidade de abelhas. Neste fenômeno são registradas abelhas mortas no entorno das colônias, várias com vestígios de produtos fitossanitários sintéticos (MAP 2017; GRIGORI, 2019).

Os inseticidas químicos sintéticos estão intimamente relacionados à mortalidade das abelhas, pois a maioria deles não apresenta seletividade para organismos não-alvos, como os polinizadores. Os inseticidas têm o potencial de causar a morte imediata de abelhas e também podem causar efeitos negativos mesmo em doses subletais e ainda interferir no funcionamento da colônia (WOLFF et al., 2008; AMARO E GODINHO, 2012; TOSI et al., 2017; CATAE et al., 2018a). Nesse sentido, entre os estudos realizados relacionados à exposição de abelhas a agrotóxicos, entre os anos de 1945 a meados de 2020, aproximadamente, 58% investigaram a possível ocorrência de efeitos subletais e 27% investigaram o efeito letal (ABATI et al., 2021). No entanto, a maioria dos estudos concentra-se na avaliação de grupos químicos de inseticidas isolados, o que dificilmente ocorre em campo.

Em alguns países, como o Brasil, a grande maioria dos produtos fitossanitários sintéticos são comercializados contendo mais de um grupo químico, a fim de aumentar o espectro de ação e eficiência no controle de pragas. Entre os inseticidas usados nos últimos anos, estão os compostos por mais de um grupo químico, com um neonicotinoide e um piretróide que atuam como inseticida sistêmico e de contato, respectivamente, usado principalmente no controle do percevejo-marrom-da-soja (*Euschistus heros* Fabr., 1974 Hemiptera: Pentatomidae) (AGROFIT, 2021). Esses inseticidas quando utilizados sozinhos e em concentrações subletais, afetam o comportamento/aprendizado das abelhas, reduzindo a capacidade das operárias de *A. mellifera* de realizar algumas atividades determinadas pela faixa etária dentro das colônias, e reduzindo também sua longevidade (LAURINO et al., 2011; THANY et al., 2015). No entanto, a aplicação de misturas de diferentes grupos químicos de inseticidas pode causar efeitos negativos sobre esses polinizadores (WANG et al., 2020).

Portanto, torna-se necessário pesquisar constantemente o impacto dos inseticidas registrado, sobre os organismos não-alvo. A mistura de tiametoxam + lambda cialotrina é um inseticida amplamente utilizado em culturas anuais para o controle de pragas, principalmente no controle de percevejos em soja. Desta forma é importante conhecer seus efeitos colaterais no ambiente e em insetos úteis como as

abelhas *A. mellifera*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos letal, subletais e o efeito residual da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, em laboratório, simulando a presença de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em campo após a aplicação deste produto.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 OBTENÇÃO DAS ABELHAS E DO PRODUTO

No apiário experimental UNEPE – Apicultura (Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Dois Vizinhos, foram selecionadas, ao acaso, cinco colônias de abelhas. Nessas colônias foram selecionados e marcados quadros contendo ovos de um dia. Após 18 dias, esses quadros foram alocados em sacos de papel kraft, selados e perfurados com uma agulha e levados até o Laboratório de Controle Biológico, onde foram mantidos por mais dois dias em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 5\%$, fotofase de 12 horas) para emergência das abelhas operárias. O produto utilizado nos bioensaios a mistura de tiametoxam (14,1% m/v neonicotinoide) + lambda cialotrina (10,6% m/v piretroide) + nafta de petróleo (7,27% m/v) + outros ingredientes (87,2 m/v) - Engeo Pleno®, em diferentes concentrações (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Tratamentos utilizados, com base na cultura da soja, recomendada no controle do percevejo-marrom-da-soja (*Euschistus heros*) com as diferentes concentrações da mistura tiametoxam (14,1% m/v neonicotinoide) + lambda cialotrina (10,6% m/v piretroide) + nafta de petróleo (7,27% m/v) + outros ingredientes (87,2 m/v) (Engeo Pleno®).

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO UTILIZADO	g do p.c/mL
T1	Controle – água destilada autoclavada	-
T2	0,625%*	$3,09 \times 10^{-4}$
T3	1,25%*	$6,175 \times 10^{-4}$
T4	2,5%*	$12,35 \times 10^{-4}$
T5	5%*	$24,7 \times 10^{-4}$

T6	10%*	49,4x10 ⁻⁴
----	------	-----------------------

* Em relação à concentração recomendada pelo fabricante.

5.2.2 CONTATO DE ABELHAS EM SUPERFÍCIE CONTENDO O PRODUTO.

Placas de Petri de vidro (15 cm Ø x 1,5 cm de altura) foram pulverizadas com 290 µL das caldas dos produtos, na base das placas de Petri, com aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante (1,2 kgf/cm²), de acordo com as concentrações descritas na Tabela 1. Após a pulverização das placas, as mesmas foram deixadas em câmara de fluxo laminar, até secarem completamente. Em seguida, as abelhas operárias, com 24 a 48 horas de idade, foram anestesiadas por, aproximadamente, 120 segundos, com CO₂, e foram colocadas em grupos de 20 abelhas por placa (POTRICH et al., 2018; COLOMBO et al., 2019).

Após duas horas de contato com o produto as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (15 cm de altura x 10 cm de Ø) onde receberam algodão embebido em água destilada e pasta Cândi (50 g de açúcar de confeitiro + 10 mL de mel puro).

O bioensaio foi mantido em sala climatizada (27 ± 2°C, U.R. de 60 ± 5%) e a mortalidade das operárias avaliada às seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72, 96 e 120 horas após o contato com as diferentes concentrações do produto (metodologia adaptada de BAPTISTA et al., 2009; POTRICH et al., 2018). Para o bioensaio de longevidade foram realizadas cinco repetições, com 20 abelhas em cada repetição.

5.2.3 DESLOCAMENTO VERTICAL E RETOMADA DE VOO

Duas repetições, com 20 abelhas em cada, oriundas do bioensaio de contato foram utilizadas para os ensaios de deslocamento vertical e retomada de voo (queda). Após as duas horas de contato das abelhas com as concentrações de 0,625% (T2), 10% (T6) e controle (T1), as abelhas foram submetidas à análise de deslocamento vertical. Para isso, 10 abelhas de cada tratamento, foram

selecionadas para deslocamento vertical, e 10 para retomada de voo, sendo cada abelha considerada uma repetição.

Foi utilizada uma torre de voo de madeira (35 cm x 35 cm de base e 105 cm de altura), a qual contém uma fonte luminosa na parte superior e uma fita métrica interna. A torre contém cinco níveis/estratos (adaptado de Tomé et al. 2015).

Na análise de deslocamento vertical (voo), as abelhas foram liberadas uma a uma, na base da torre, e durante um minuto seu comportamento foi avaliado, anotando-se o estrato mais alto que cada abelha alcançou. Para o teste de retomada de voo (queda), as abelhas foram liberadas na parte superior da torre, próximas à fonte luminosa, e foi avaliado em qual dos estratos cada abelha teve a capacidade de retomar o voo.

5.2.4 CAMINHAMENTO

Foram preparadas 14 placas de Petri (15 cm Ø X 1,5 cm), as quais foram pulverizadas, internamente, na base da placa, com os tratamentos T1 (controle), T2 (0,625%) e T6 (10%). Em seguida, cada placa contendo o tratamento recebeu uma abelha operária, que continha de 24 a 48 horas de idade. Estas abelhas foram submetidas à análise de caminhamento. Para isto a placa contendo a abelha foi alocada em um suporte universal para captura do vídeo. Este experimento foi conduzido em sala a temperatura ambiente, em média 26°C e sem fonte luminosa artificial.

Foi registrado o comportamento das abelhas durante 11 minutos, sendo descartado o minuto inicial, por ser considerado o tempo de adaptação. Os vídeos foram analisados com auxílio do software Bee move (o qual está em fase de registro): distância percorrida, tempo de caminhamento, tempo de descanso e velocidade de caminhamento. O delineamento foi inteiramente casualizado, no qual cada placa foi considerada uma repetição. O software Bee move extraiu e registrou os parâmetros de interesse, automaticamente, para posterior análise estatística (metodologia adaptada de LIBARDONI et al, 2021).

5.2.5 EFEITO RESIDUAL (SEMI CAMPO)

O produto na concentração recomendada pelo fabricante, foi pulverizado em campo, com pulverizador costal, em folhas de soja cultivar Zeus, estágio fenológico de 5.3. A pulverização ocorreu aos 18, 15, 12, nove, seis e três dias antes da realização do bioensaio, aqui denominado de efeito residual. Além disso, também foi realizada uma aplicação do produto no dia que todas as folhas foram coletadas (zero dias) (Figura 5.1). Os talhões para aplicação do produto foram sorteados.



Figura 5.1: Croqui da área onde estava plantada a soja, com os períodos de aplicação do produto sobre as plantas, em cada talhão.

Foram pegas ao acaso 10 plantas de cada talhão, mas preferencialmente as que estavam mais ao centro do talhão (para evitar os efeitos de deriva). De cada planta foram coletadas de seis a oito folhas, as quais foram acondicionadas em sacos de papel kraft, devidamente identificados e levadas ao Laboratório de Controle Biológico. No laboratório, as folhas foram dispostas em bandejas de plástico e colocadas em câmara de fluxo laminar para secagem pois as coletas foram realizadas às 7 horas da manhã e havia orvalho.

Posteriormente, as folhas foram dispostas em uma placa de Petri (15 cm de Ø x 1,5 cm de altura), sendo que cada placa recebeu três folhas do mesmo tratamento. Cada tratamento foi composto por cinco placas, sendo cada placa considerada uma

repetição.

As abelhas operárias, com idade de 24 a 48 horas, foram anestesiadas por até 120 segundos com CO₂ e colocadas 20 abelhas em cada placa, onde permaneceram por duas horas para o contato com as folhas tratadas. Após esse período, as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (15 cm de altura × 10 cm de Ø) onde receberam algodão embebido em água destilada e pasta Cândi (50 g de açúcar de confeitaria + 10 mL de mel puro). Os parâmetros de avaliação foram os mesmos descritos no bioensaio de contato em superfície.

5.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os dados de sobrevivência e do ensaio de semi-campo, foram realizadas análises de sobrevivência, usando Kaplan-Meier. Já para caminhamento das abelhas foi utilizado teste de comparação de médias (Tukey), para verificar se houve ou não diferença entre os tratamentos para p-valor <0,05. No bioensaio de deslocamento vertical (voo e queda) foram utilizados modelos lineares generalizados, regressão ordinal, através do teste de Wald (qui-quadrado), todas as análises foram feitas no software R.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 CONTATO DIRETO DE ABELHAS EM SUPERFÍCIE CONTENDO O PRODUTO

Todos os tratamentos reduziram a longevidade das abelhas em relação ao controle. Ao final das 120 horas de avaliação do experimento, 61% das abelhas oriundas da testemunha estavam vivas. Já o tratamento que menos interferiu na longevidade das abelhas foi T2 (0,625%), tendo 6% de abelhas vivas ao final das 144 horas (Figura 5.2). Todas as abelhas provenientes dos tratamentos T3 (1,25%),

T4 (2,5%) e T5 (5%) estavam mortas ao final de 96 horas de avaliação (Figura 5.2). E após 48 horas da realização do experimento, todas as abelhas provenientes do tratamento T6 (10%) já estavam mortas (Figura 5.2).

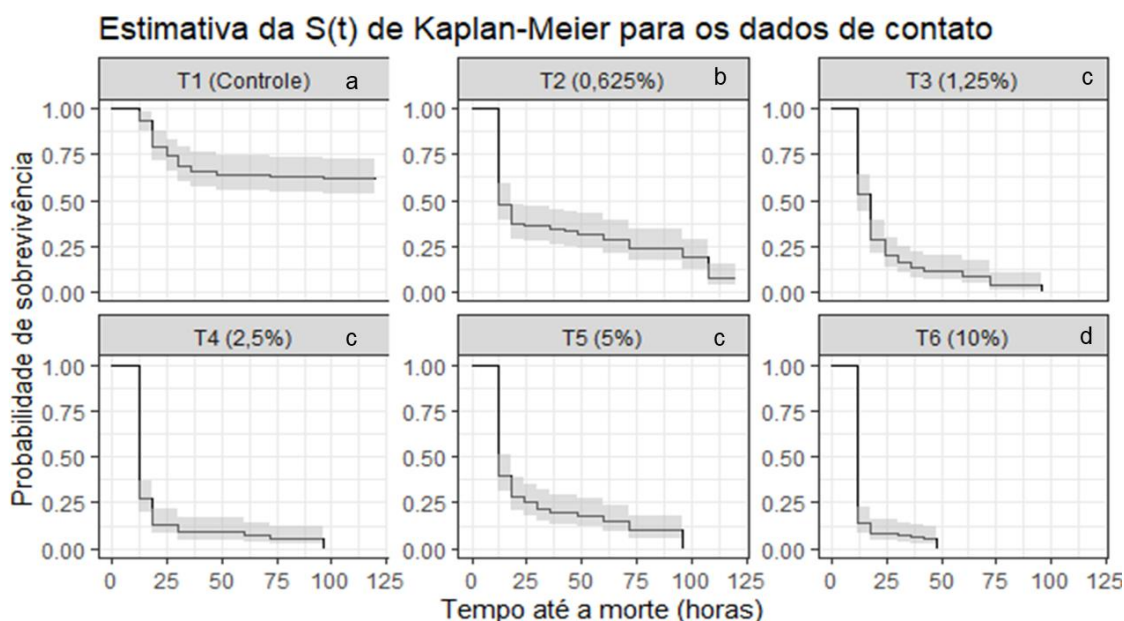


Figura 5.2. Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície vítrea tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina. Letras semelhantes nos gráficos indicam que não houve diferença significativa com $p < 0,05$, segundo análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank.

5.3.2 DESLOCAMENTO VERTICAL E RETOMADA DE VOO

As abelhas oriundas dos tratamentos contendo da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina + nafta de petróleo + outros ingredientes a 10% e 0,625% apresentaram dificuldade na retomada de voo (queda), quando comparadas com as abelhas do controle, apesar de que, estatisticamente essa diferença não foi observada, pois o número de amostras foi insuficiente (Figura 5.3). No deslocamento vertical (voo), os tratamentos com 0,625% e 10% apresentaram diferença em relação ao controle, onde as abelhas atingiram menores estratos (Figura 5.3)

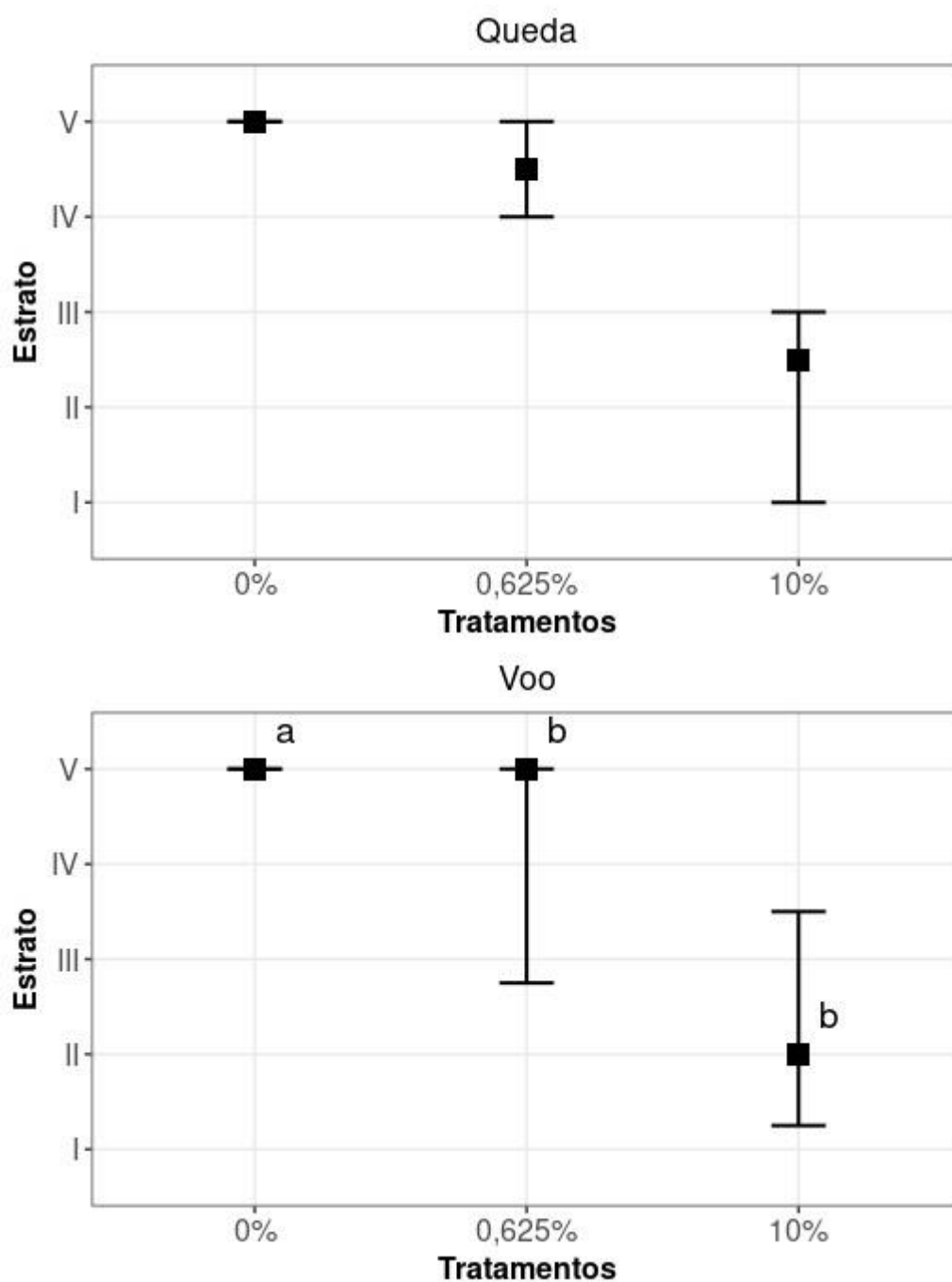


Figura 5.3: Retomada de voo (queda) e deslocamento vertical (voo) de abelhas operárias recém-emergidas (*Apis mellifera*), após contato com superfície tratada com da mistura de tiametoxam, a 0,625% e 10% da concentração recomendada pelo fabricante. Os quadrados representam os valores medianos dos estratos para cada tratamento com os respectivos primeiro e terceiro quartis. As mesmas letras minúsculas dentro das figuras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) para o teste de comparação de múltiplos de Tukey.

5.3.3 CAMINHAMENTO

A velocidade média, a distância percorrida, o tempo de caminhada e o tempo de descanso das abelhas oriundas do tratamento contendo 10% a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina + nafta de petróleo + outros ingredientes, foram afetados, diferindo tanto das abelhas oriundas do tratamento a 0,625% quanto das abelhas do controle (Tabela 5.2 e Fig. 5.4).

Tabela 5.2: Velocidade média das operárias de *A. mellifera* africanizada (mm / s), distância percorrida (mm), tempo (s) de caminhada e tempo (s) de descanso das abelhas operárias (que continham entre 24 e 48 horas) entrarem em contato com superfície tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina [\pm desvio padrão (DP)].

Tratamento	Velocidade média (mm/s) \pm DP	Distância percorrida (mm) \pm DP	Tempo de descanso (s) \pm DP	Tempo de caminhada (s) \pm DP
Controle	0,69 \pm 0,1 a	405,7 \pm 43,1 a	26,0 \pm 9,5 b	574 \pm 9,5 a
0,625% (3,09x10 ⁻⁴ g/mL)	0,55 \pm 0,1 a	331,7 \pm 52,5 a	27,6 \pm 18,0 b	572 \pm 18,0 a
10 (49,4x10 ⁻⁴ g/mL)	0,32 \pm 0,1 b	145,3 \pm 35,3 b	146,75 \pm 56,7 a	453 \pm 56,7 b

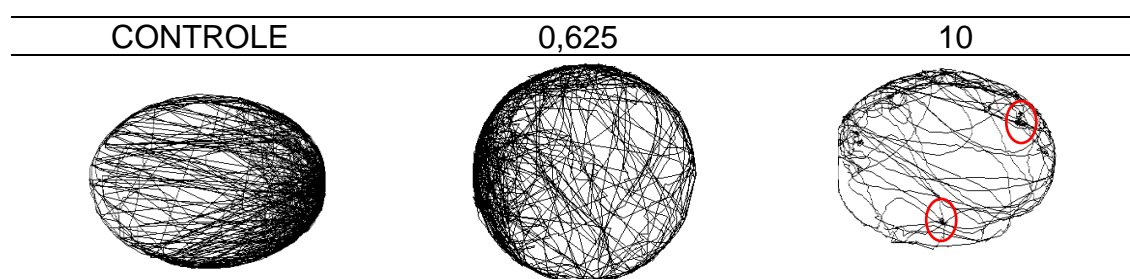


Figura 5.4: Trajeto percorrido pelas abelhas operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície tratada com diferentes concentrações da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina. Em vermelho, locais onde a abelha ficou mais tempo em descanso.

5.3.4 EFEITO RESIDUAL (SEMI-CAMPO)

As abelhas oriundas do tratamento zero dias, ou seja, que entraram em

contato com as folhas pulverizadas com a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, no mesmo dia do bioensaio, morreram depois de duas horas de contato, essas abelhas apresentaram o aparelho bucal externalizado, o que demonstra intoxicação. Desta forma, devido a morte repentina, este tratamento não apareceu na Figura 5.5, pois não foi possível incluir nas análises.

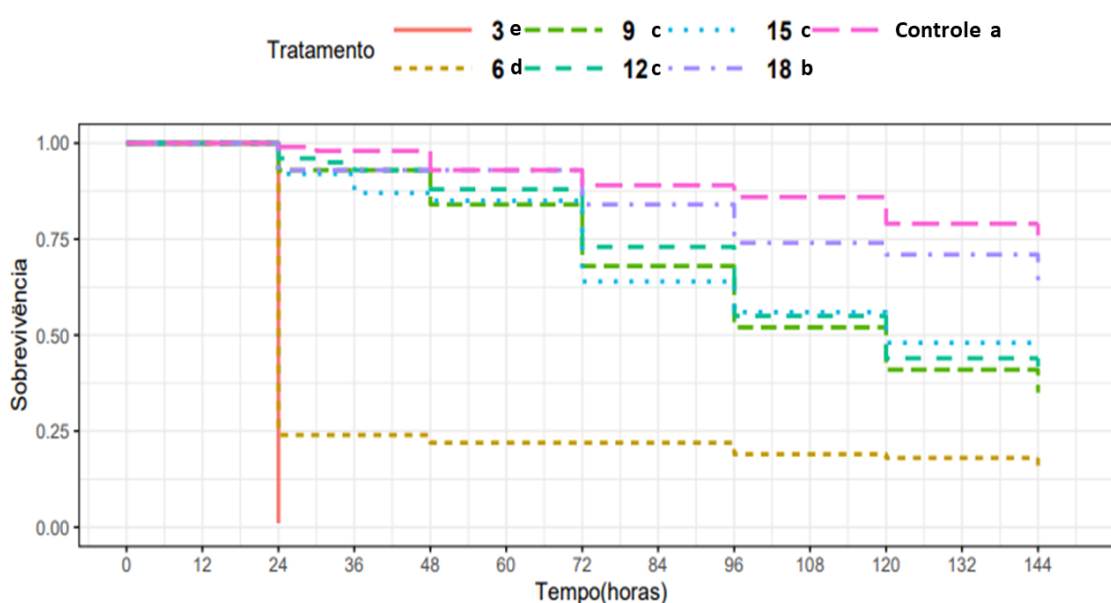


Figura 5.5: Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de *Apis mellifera*, de Kaplan - Meier, ajustado ao período (h) após contato com folhas de soja pulverizadas com a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, em diferentes tempos, para avaliar o efeito residual do produto. Temperatura ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $60\% \pm 10\%$; fotoperíodo de 12 h). As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

Todas as abelhas que entraram em contato com as folhas de soja com residual do produto de três dias morreram 24 horas após a implantação do bioensaio (na primeira avaliação realizada) enquanto 15% das abelhas estavam vivas, ao final das 144 horas de experimento, em contato com o tratamento com residual do produto de seis dias.

Ao final das 144 horas, 34, 37, 47 e 60% das abelhas oriundas dos tratamentos com residual de produto de nove, 12, 15 e 18 dias enquanto 75% das abelhas oriundas do controle estavam vivas.

5.4 DISCUSSÃO

Pode-se observar efeitos letal e também efeitos subletais da mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, sobre *A. mellifera* africanizada. Os efeitos subletais foram observados com alteração comportamental das abelhas, quando em contato com este inseticida.

Neste trabalho, foram simuladas situações de campo como a pulverização dos produtos e posterior contato das abelhas com estes (CARVALHO et al., 2009; COLOMBO et al., 2020; POTRICH et al., 2020), o que explica a não utilização dos padrões da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), os quais avaliam a exposição aguda das abelhas a esses produtos fitossanitários sintéticos através do fornecimento via oral ou por micropipetagem no tórax (OCDE 1998).

Os neonicotinoides podem agir por contato ou ingestão apesar da ação sistêmica ser pronunciada, e, por isso, são considerados produtos sistêmicos com persistência a longo prazo e este grupo atua ligando-se aos receptores de acetilcolina. Isso ocasiona a ativação dos receptores de acetilcolina tornando-a mais prolongada, ocasionando alta excitabilidade do sistema nervoso central, levando o inseto a morte devido a hiperexcitação (GALLO et al., 2002; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; VAN DER SLUIJS et al., 2013; TAILLEBOIS et al., 2018). Já os inseticidas do grupo químico dos piretroides agem por ingestão e contato e atuam na abertura e fechamento dos canais de sódio. Ou seja, os íons de sódio ficam mais tempo entrando nas células e acaba despolarizando a membrana e abrindo os canais de cálcio, o que leva à paralisia e morte dos insetos (GALLO et al., 2002; AZNARALEMANY; ELJARRAT, 2020).

Os neonicotinoides alteram a expressão funcional robusta de receptores de acetilcolina nicotínicos de insetos mesmo a 10 ppM, uma concentração muito inferior àquela a que as abelhas são expostas no campo, podendo causar prejuízos a estes insetos, alterando o comportamento de recuperação olfativa nas abelhas, ou até mesmo funções de localização e voo (IHARA et al., 2020). Além disso, avaliações de deslocamento vertical, retomada de voo, velocidade de caminhamento, tempo de

caminhamento, tempo de descanso e distância percorrida são avaliações comportamentais relacionadas a funções motoras fatores estes que estão ligados com a capacidade de forrageamento, orientação e capacidade de coleta de néctar e pólen das plantas. Essas funções são essenciais para manutenção das colônias, e quando as abelhas forrageiras estão no campo elas podem entrar em contato com os produtos, levando-os consigo para dentro de suas colônias ou então, não conseguindo retornar por disfunções causadas por intoxicação (WOLFF; REIS; SANTOS, 2008; TOSI; NIEH, 2017; CATAE et al., 2018). O bioensaio de caminhamento foi realizado para avaliar possíveis efeitos subletais dos produtos pulverizados sobre superfície tratada, para avaliar interferências na capacidade de movimentação de *A. mellifera*,

Os resultados deste trabalho demonstram que a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina, causou efeitos negativos na sobrevivência e comportamento das abelhas, mesmo que em concentrações muito baixas (0,625%) o que também foi visto em outros trabalhos, onde pesquisadores realizaram testes de repelência, análise de mortalidade por contato e ingestão e testes de vôo. O produto testado, um inseticida neonicotinoide, causou mortalidade acima de 90% em todas as vias de exposição testadas e, além disso, apresentou elevada persistência de resíduos nas plantas (GOMES et al., 2019), o que também ocorreu no presente trabalho, no qual, na concentração recomendada pelo fabricante, até 18 dias após a aplicação no campo, o produto apresentou efeito residual sobre a longevidade das abelhas.

O piretroide fenopropatrina, quando pulverizado em campo na cultura do citros e com efeito residual em três dias, provocou 100% de mortalidade nas abelhas operárias de *A. mellifera*, 24 horas após a exposição. Já no efeito residual de sete dias apenas 40% das abelhas expostas morreram e aos 14 dias 15 % das abelhas (CHEN et al., 2017).

Avaliar o efeito residual é importante pois a maioria dos produtos comerciais utilizados para o controle de pragas, apresenta um intervalo entre as aplicações (geralmente 10 a 15 dias) (AGROFIT, 2021), os quais devem ser respeitados, principalmente visando o efeito que eles podem ter sobre os polinizadores. Além disso, quem utiliza esses produtos deve aplicar no campo em momentos em que os

polinizadores não estão forrageando e indo em busca de pólen e néctar, para assim evitar o contato com o produto ou com o efeito residual. Também o conhecimento dos efeitos residuais pode ajudar o produtor nas estratégias de utilização tanto de aplicações espaçadas no tempo como em locais onde as abelhas provavelmente não terão contato com os produtos. Também, estes produtos que muitas vezes, podem não levar a morte do inseto, como das abelhas, mas podem causar efeitos subletais, os quais foram comprovados nos experimentos realizados neste estudo, como alteração da rota de voo e incapacidade de retornar a colônia de origem.

5.5 CONCLUSÃO

O inseticida Engeo Pleno, uma mistura de tiametoxam + lambda cialotrina + nafta de petróleo + outros ingredientes, não é seletiva para operárias de *A. mellifera* africanizada. Mesmo em concentrações baixas do produto (0,625%) as abelhas têm a longevidade reduzida. O inseticida reduz a capacidade de voo e retomada de voo, bem como o caminhamento. O produto apresenta efeito residual de até 18 dias para *A. mellifera* africanizada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos produtos a base de fungos que foram testados, apenas *T. harzianum* foi totalmente seletivo, em laboratório, a operárias de *A. mellifera* africanizada, sendo considerado seguro. Enquanto os produtos à base *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e *M. anisopliae*, apesar de também serem considerados seguros, se mostraram menos seletivos nos bioensaios de laboratório, sobre operárias africanizadas de *A. mellifera*.

O pólen das variedades testadas, Fórmula (Cry1AB), MG600PW (Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) e MG580PW (Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) não causou efeitos letais às abelhas africanizadas de *A. mellifera*, porém causou leves alterações nas fibras musculares externas do intestino médio quando estas foram alimentadas com o pólen de milho transgênico Bt MG600PW e MG580PW.

A mistura de tiametoxam + lambda cialotrina + nafta de petróleo + outros ingredientes (Engeo Pleno®) em diferentes concentrações, inclusive na concentração mais baixa (0,625%) causou redução na longevidade das abelhas e alterou a capacidade de deslocamento vertical, retomada de voo e capacidade de caminhamento. Além disso o produto apresentou efeito residual de até 18 dias para operárias de *A. mellifera* africanizada.

Estudos com os produtos que foram considerados seguros às abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada testados em laboratório, possivelmente são seguros a campo. Pois, nos bioensaios laboratoriais, o contato com os produtos é direto e extremo, e a campo este contato é, provavelmente menos intenso e frequente o que leva a quer que os produtos que foram seletivos no laboratório também o serão a campo. Já os menos seletivos em laboratório, poderão ter um menor impacto a campo pela qualidade da cobertura da aplicação e pela maior desativação por fatores bióticos e principalmente abióticos. Desta forma, estudos semelhantes dever ser realizados constantemente para verificar a segurança do que está sendo usado a campo, para que insetos benéficos, como as abelhas, não sejam afetados.

Além disso, essas informações podem também serem utilizadas para traçar

estratégias no manejo das populações de pragas, considerando aspectos de florescimento e também espaçamento entre as aplicações. Além da utilização do manejo integrado de pragas como alternativa para o controle de pragas sem afetar os organismos não alvo, como as abelhas.

REFERÊNCIAS

ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; MACIEL, R. M. A.; COLOMBO, F. C.; LIBARDONI, G.; BATTISTI, L.; LOZANO, E. R.; GHISI, N. de C.; COSTA-MAIA, F. M.; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 25, p. 32282-32298, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>.

ABEMEL, Associação Brasileira de Exportadores de Mel. Setor apícola brasileiro em números: Inteligência comercial. 2016. Disponível em: <http://www.conap.coop.br/wp-content/uploads/2017/01/INTELIGÊNCIA-COMERCIAL-ABEMEL_DEZEMBRO-CONSOLIDADO.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2018.

ABREU, L. de. INTERFERÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO EM COLÔNIAS DE *Apis mellifera* E DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS EM MEL. 2015. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ABOU-SHAARA, H. F.; EID, K. S. A. Increasing the profitability of propolis production in honey bee colonies by utilizing remote sensing techniques to spot locations of trees as potential sources of resin. **Remote Sensing Letters**, v. 10, n. 9, p. 922-927, 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/2150704x.2019.1633488>.

ABROL, D. P.; GORKA, A.K.; ANSARI, M.J.; AL-GHAMDI, A.; AL-KAHTANI, S. Impact of insect pollinators on yield and fruit quality of strawberry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-7, 2017.

ACHARYA, R.; YU, Y.; SHIM, J.; LEE, K. Virulence of four entomopathogenic nematodes against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fabricius. **Biological Control**, v. 150, p. 104348, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104348>.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 14 jul. 2018.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 27 mai. 2021.

ALCALÁ-GÓMEZ, J.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; ÁNGEL-SAHAGÓN, C.; VITELA-MENDOZA, I.; RAMOS-PARRA, M. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates and the effects of fungal infection on the reproduction potential of *Rhaphichephalus microplus* engorged females. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 8, p. 931-939, 3 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2017.1366422>.

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

AL-GHAMDI, A.; ADGABA, N.; GETACHEW, A.; TADESSE, Y. New approach for determination of an optimum honeybee colony's carrying capacity based on productivity and nectar secretion potential of bee forage species. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 92-100, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.020>.

AMARO, J. T.; BUENO, A. de F.; NEVES, P. M. O. J.; SILVA, D. M. da; POMARI-FERNANDES, A.; FAVETTI, B. M. Selectivity of different biological products to the egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 3, p. 195-197, jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2018.04.003>.

AMARO, J T; BUENO, A F; POMARI-FERNANDES, A F; NEVES, P M O J. Selectivity of organic products to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 489-497, 13 ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-015-0317-2>.

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

AMIS, Agriculture Management Information Systems Statistics. Brazil - total cereals at a glance Market Summary. Disponível em: <<http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

ANDERSON, D. L.; TRUEMAN, J.W.H. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.165-189, 2000.

ANDRADE, M. A.; MELLO, C. R. de; BESKOW, S. Simulação hidrológica em uma bacia hidrográfica representativa dos Latossolos na região Alto Rio Grande, MG. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 1, p. 69-76, jan. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-43662013000100010>.

ARPAIA, S.; SMAGGHE, G.; SWEET, J. B. Biosafety of bee pollinators in genetically modified agro-ecosystems: current approach and further development in the EU. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2659-2666, 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.6287>.

AZNAR-ALEMANY, O.; ELJARRAT, E. Introduction to Pyrethroid Insecticides: Chemical Structures, Properties, Mode of Action and Use. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 92, p.1–16,2020.

BALLANTYNE, G.; BALDOCK, K.C.R; RENDELL, L.; WILLMER, P.G. Pollinator importance networks illustrate the crucial value of bees in a highly speciose plant

community. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-11, 2017.

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

BARRATT, B. I. P.; MORAN, V. C.; BIGLER, F.; VAN LENTEREN, J.C. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **Biocontrol**, v. 63, n. 1, p.155-167, 2017.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781999000200028>.

BIZZOCCHI, L. Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *Apis mellifera* L. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BOMFIM, I. G. A.; OLIVEIRA, M. O. de; FREITAS, B. M. Curso Técnico em Apicultura: Biologia das abelhas. Fortaleza: Uece, 2017.

BOTHA, A.; ERASMUS, A.; DUPLESSIS, H; BERG, J. D. Efficacy of Bt maize for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 3, p. 1260-1266, 2019. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/toz048>.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v.86, p.40–47, 2016

BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; BRIGHENTI, C. R. G.; CARVALHO, S. M. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, 279-289, 2007.

BÚUAERT, D. C.; VAN POUCKE, M.; SMET, L. de; VERBEKE, W. GRAAF, D. C. de; PEELMAN, L. QPCR assays with dual-labeled probes for genotyping honey bee variants associated with *Varroa* resistance. **Bmc Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-021-02886-x>.

CAPALBO, D. M. F.; FONTES, E. M. G. **GMO guidelines project**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 56p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 38).

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, F. C.; BUENO FILHO, J. S. S.;

BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de Acaricidas/Inseticidas empregados na Citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597-606, 2009.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; PRATAVIEIRA, M.; MENEGASSO, A. R. da S.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 109-121, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>.

CATARINO, R.; BRETAGNOLLE, V.; PERROT, T.; VIALLOUX, F.; GABA, S. Bee pollination outperforms pesticides for oilseed crop production and profitability. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 286, n. 1912, 9 out. 2019. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1550>.

CHEN, X. D.; GILL, T. A.; PELZ-STELINSKI, K. S.; STELINSKI, L. L. Risk assessment of various insecticides used for management of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Florida citrus, against honey bee, *Apis mellifera*. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 3, p. 351-359, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-017-1768-5>.

CHRISTEN, V.; JOHO, Y.; VOGEL, M.; FENT, K. Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, v. 244, p. 247-256, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.030>.

COLOMBO, F. C.; MACIEL, R. M. A.; LIBARDONI, G.; RAULINO, F.; LOZANO, E. R.; MAIA, F. M. C.; FREITAS, P. F.; NEVES, P. M. O. J.; POTRICH, M. Longevity of *Apis mellifera* workers fed on a diet incorporating entomopathogens. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. 1-7, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000492017>.

COLOMBO, F. C.; MACIEL, R. M. A.; ABATI, R.; RAULINO-DOMANSKI, F.; LONGHI, S. J.; COSTA-MAIA, F. M.; VISMARA, E. de S.; LOZANO, E. R.; POTRICH, M. Do *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* affect worker survival and the production of Africanized *Apis mellifera* queens? **Journal of Apicultural Research**, p. 1-10, 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2020.1828237>.

CONAB, Companhia Nacional do Abastecimento (Brasília). Perspectivas para a agropecuária. Brasília: Conab, 2019.

COSTA, C.C.de A.; OLIVEIRA, F.L. de. Polinização: serviços ecossistêmicos e o seu uso na agricultura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 3, p.1-10, 2013.

COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D. A.; TOLEDO, V. de A.A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. *Sistemas de produção*

agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Floresta), **Editora UTFPR**, v. 1, n. 1, p. 45-67, 2010.

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

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

DAI, P. L.; ZHOU, W.; ZHANG, J.; JIANG, W. Y.; WANG, Q.; CUI, H. J.; SUN, J. H.; WU, Y. Y.; ZHOU, T. The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). **Apidologie**, v. 43, n. 4, p. 384-391, 24 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0103-z>.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p.170-176, 2015

DING, J. N.; CHI, D. F. Ultrastructural observations of *Beauveria bassiana* infection in *Xylotrechus rusticus* larvae. **Entomological Research**, v. 48, n. 3, p. 204-213, 12 dez. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/1748-5967.12273>.

DUFOUR, C.; FOURNIER, V.; GIOVENAZZO, P. The impact of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) and cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) pollination on honey bee (*Apis mellifera* L.) colony health status. *Plos One*, V. 15, n. 1, p. 1-10, 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227970>.

D'URSO, V.; MAZZEO, G.; VACCALLUZZO, V.; SABELLA, G.; BUCCHIERI, F.; VISCUSO, R.; VITALE, D. G. M. Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea) under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 51-62, 23 maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-016-0448-4>

DYNES, T. L.; DE ROODE, J. C.; LYONS, J. I.; BERRY, J. A. DELAPLANE, K. S.; BROSI, B. J. Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 48, n. 1, p.93-101, 2017.

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

ESQUIVEL, I. L.; PARYS, K. A.; BREWER, M. J. Pollination by non-*Apis* bees and potential benefits in self-pollinating crops. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 114, n. 2, p. 257-266, 2021.

FAO, Food And Agricultural Organization Of de United Nations. Blending tradition and science to protect pollinators. Disponível em: <<http://www.fao.org/in-action/blending-tradition-and-science-to-protect-pollinators/en/>>. Acesso em: 08 jun.

2018.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Honey bee diseases and pests: a practical guide**. 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Database**. Rome. < <http://www.fao.org/faostat> > (accessed 26 Fevereiro 2021)

FARIA, M. R. de; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, p.18-21, 2001.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, mar. 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>.

FONTES, E. M. G; VALADARES-INGLIS, M. C. **CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS DA AGRICULTURA**. Brasília: Embrapa, 2020

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

FRIES, I.; CAMAZINE, S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. **Apidologie**, v. 32, n. 3, p 199-214, 2001.

FU, W.; WANG, C.; ZHU, P.; XU, W.; LI, X.; ZHU, S. A universal analytical approach for screening and monitoring of authorized and unauthorized GMOs. **Lwt**, v. 125, p. 109176, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109176>

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES S. B.; VENDAMIM, J. D.; MARCCHINI, L. C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GANDARILLA-PACHECO, F. L.; ELÍAS-SANTOS, M.; FLORES-GONZÁLEZ, M. del S.; LUNA-SANTILLANA, E. de J. de; QUINTERO-ZAPATA, I. Virulencia de blastosporas de *Isaria fumosorosea* nativas del noreste de México sobre *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 44, n. 2, p. 187-192, 31 dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.25100/socolen.v44i2.7316>.

GANUZA, M.; PASTOR, N.; BOCCOLINI, M.; ERAZO, J.; PALACIOS, S.; ODDINO, C.; REYNOSO, M. M.; ROVERA, M.; TORRES, A. M. Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 126, n. 2, p. 608-623, 29 nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14147>.

- GARRIDO-JURADO, I.; RESQUÍN-ROMERO, G.; YOUSEF-NAEF, M.; RÍOS-MORENO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Soil drenching with entomopathogenic fungi for control of the soil-dwelling life stages and adults of the same generation of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 110, n. 2, p. 242-248, 27 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1017/s000748531900052x>.
- GBESSO, G. H. F.; YABI, B. F.; DOSSOU, M. E.; LOUGBEGNON, O. T.; TENTE, B.; CODJIA, J. T. C Utilisation ethno-zoologique des produits et sous-produits des abeilles à l'Est de la Réserve de Biosphère Transfrontalière de W au Bénin. **Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires**, v. 7, n. 4, p.550-556, 2019
- GESLIN, B.; AIZEN, M. A.; GARCIA, N.; PEREIRA, A. J.; VAISSIÈRE, B. V.; GARIBALDI, L. A. The impact of honey bee colony quality on crop yield and farmers' profit in apples and pears. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 248, p.153-161, 2017.
- GOMES, I. N.; VIEIRA, K. I. C.; GONTIJO, L. M.; RESENDE, H. C.. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 97-107, 12 dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>.
- 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.
- GRACIA, M. J.; MORENO, C.; FERRER, M.; SANZ, A.; PERIBAÑEZ, M.; ESTRADA, R. Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. **Plos One**, v. 12, n. 2, p.1-14, 3 fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171633>.
- GRIGORI, P. Apicultores brasileiros encontram meio bilhão de abelhas mortas em três meses. **Agência pública/Repórter Brasil**. 2019. Disponível em: <<https://apublica.org/2019/03/apicultores-brasileiros-encontram-meio-bilhao-de-abelhas-mortas-em-tres-meses/>>. Acesso em: 24 mai. 2019.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON P. S. **Os insetos**: um resumo de entomologia. São Paulo: Roca, 480p. 2009
- HAAS-COSTA, J.; ALVES, L. F. A.; DAROS, A. A. Safety of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Gallus domesticus* L. Brazilian Archives of Biology and **Technology an International Journal**, v. 53, n.2, p. 465-471, 2010.
- HAMIDUZZAMAN, M. M.; SINIA, A.; GUZMAN-NOVOA, E.; GOODWIN, P. H. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 3, p. 237-243, 2012.

HAN, P.; NIU, C. Y.; LEI, C. L.; CUI, J. J.; DESNEUX, N. Quantification of toxins in a Cry1Ac + CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1452-1459, 11 ago. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-010-0530-z> . a

HAN, P.; NIU, C. Y.; LEI, C. L.; CUI, J. J.; DESNEUX, N. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1612-1619, 26 set. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-010-0546-4>. b

HAN, Y.; WANG, H.; CHEN, J.; CAI, W.; HUA, H.. No impact of transgenic Cry2Aa rice on *Anagrus nilaparvatae*, an egg parasitoid of *Nilaparvata lugens*, in laboratory tests. **Biological Control**, v. 82, p. 46-51, mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.005>.

HELLMICH, R. L.; ALBAJES, R.; BERGVINSON, D.; PRASIFKA, J. R.; WANG, Z. Y.; WEISS, M. J. The Present and Future Role of Insect-Resistant Genetically Modified Maize in IPM. **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops Within IPM Programs**, p. 119-158, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8373-0_5.

HENDRIKSMA, H. P.; KÜTING, M.; HÄRTEL, S.; NÄTHER, A.; DOHRMANN, A. B.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TEBBE, C. C. Effect of Stacked Insecticidal Cry Proteins from Maize Pollen on Nurse Bees (*Apis mellifera carnica*) and Their Gut Bacteria. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 22 mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059589>.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, n. 6144, p. 160-163, nov. 1987. <http://dx.doi.org/10.1038/330160a0>.

HIPÓLITO, J., NUNES, D. O., ANGEL-COCA, C.; MAHHALMANN, T.; VIANA, B. F. Performance, Effectiveness, and Efficiency of Honeybees as Pollinators of *Coffea Arabica* (Gentianales, Rubiaceae). **Neotropical Entomology**, v. 49, p. 501–510, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00785-8>

HOFES, J. L.; SCHOEMAN, A.; MELLET, M.; VAISSAYRE, M. Impact des cotonniers génétiquement modifiés sur la biodiversité de la faune entomologique: le cas du coton bt en afrique du sud. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 25, n. 02, p. 63-72, jun. 2005. <http://dx.doi.org/10.1079/ijt200562>.

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

HOLANDA-NETO, J. P. de; PAIVA, C. da S.; MELO, S. B. de; PAIVA, A. C. C. de;

MARACAJÁ, P. B.; SILVA, A. F. da; PEREIRA, D. S. Comportamento de abandono de abelhas africanizadas em apiários durante a entressafra, na região do Alto Oeste Potiguar, Brasil. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p.72-85, 2015.

HOOD, Mike. Colony collapse disorder (CCD). *Britannica Academic*, v. 1, p.1-5, 2019.

HORIKOSHI, R. J; VERTUAN, H.; A CASTRO, A.; MORRELL, K.; GRIFFITH, C.; EVANS, A.; TAN, J.; ASIIMWE, P.; ANDERSON, H.; JOSÉ, M. O M. A new generation of Bt maize for control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Pest Management Science*, v. 77, n. 8, p. 3727-3736, abr. 2021. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/ps.6334>.

HRISTOV, P.; SHUMKOVA, R.; PALOVA, N.; NEOV, B. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: a mini-review. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 166, 30 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci7040166>.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal. Brasil: IBGE, 2020.

IHARA, M.; FURUTANI, S.; SHIGETOU, S.; SHIMADA, S.; NIKI, K.; KOMORI, Y.; KAMIYA, M.; KOIZUMI, W.; MAGARA, L.; HIKIDA, M. Cofactor-enabled functional expression of fruit fly, honeybee, and bumblebee nicotinic receptors reveals picomolar neonicotinoid actions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16283-16291, 1 jul. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2003667117>.

ISAAA. GM Crop Events approved in Brazil. Disponível em:
<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/approvedeventsin/default.asp?CountryID=BR&Country=Brazil>. Acesso em: 27 maio 2021.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Disponível em: <https://www.isaaa.org/inbrief/default.asp>. Acesso em: 26 abr. 2021.

JAMES, R. R.; MCGUIRE, M. R.; LELAND, J. E. Susceptibility of Adult Alfalfa Leafcutting Bees and Honey Bees to a Microbial Control Agent, *Beauveria bassiana*. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p.13-21, 2012.

KANGA, L. H. B.; ADAMCZYK, J; PATT, J; GRACIA. C.; CASCINO, J. 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.

KAPLAN, D. H.; WINKLERPRINS, A. M. G. A. Forum On Role Of Genetically Modified Organisms In The Future Of Food And Agriculture. **Geographical Review**, v. 107, n. 4, p. 557-558, 10 jul. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/gere.12252>.

KHALIFA, S. A.; ELSHAFIEY, E. H.; SHETAIA, A. A.; EL-WAHED, A. A. A., ALGETHAMI, A. F., MUSHARRAF, S. G., ALAJMI, M. F.; ZHAO, C.; MARSY, S. H. D.; ABDEL-DAIM, M. M.; HALABI, M. F.; KAI, G.; NAGGAR, Y. A.; BUSHR, M.; DIAB, M. A. M.; EL-SEEDI, H. R. Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021.

KULHANEK, K.; STEINHAEUER, N.; RENNICH, K.; CARON, C.D.; SAGILI, R. R.; PETTIS, J. S.; ELLIS, J. D.; WILSON, M. E.; WILKES, J. T.; ROSE, D. R. T. R.; LEE, K.; RANGE, J.; VAN-ENGELSDORP, D. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 4, p.328-340, 2017.

LARA, J.M.; FERNÁNDEZ, C. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* with pollinators. **Ecoletter**, p. 1-5, 2014.

LI, H.; ORR, M. C.; LUO, A.; DOU, F.; KOU, R.; HU, F.; ZHU, C.; HUANG, D. Relationships between wild bee abundance and fruit set of *Camellia oleifera* Abel. **Journal of Applied Entomology**, v. 145, n. 4, p. 277-285, 15 dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12849>.

LI, J.; XIE, J.; ZENG, D.; XIA, Y.; PENG, G.. Effective control of *Frankliniella occidentalis* by *Metarhizium anisopliae* CQMa421 under field conditions. **Journal Of Pest Science**, v. 94, n. 1, p. 111-117, 30 abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-020-01223-9>.

LIBARDONI, G.; NEVES, P. M. O. J.; ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; COSTA-MAIA, F. M.; VISMARA, E. de S.; LOZANO, E. R.; POTRICH, M. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 10 fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-82874-1>

LIU, F.; LUO, J.; ZHU, X.; ZHAO, C.; NIU, L.; CUI, J.. Transgenic Cry1Ac/CpTI cotton assessment finds no detrimental effects on the insect predator *Chrysoperla sinica*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 208, p. 1-8, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111680>.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. São Paulo: Instituto Biológico, 2015. 28 p.

MANSOUR, R.; BIONDI, A. Releasing natural enemies and applying microbial and botanical pesticides for managing *Tuta absoluta* in the MENA region. **Phytoparasitica**, v. 49, n. 2, p. 179-194, 10 set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-020-00849-w>.

MATOS, A. K. V. de. Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas. Cadernos da Fucamp, v. 10, n. 12, p. 1-17, jul. 2010.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 239-244, mar. 2011

MENG, J.; MABUBU, J. I.; HAN, Y.; HE, Y.; ZHAO, J.; HUA, H.; FENG, Y.; WU, G.. No impact of transgenic cry1C rice on the rove beetle *Paederus fuscipes*, a generalist predator of brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 22 jul. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep30303>.

MESSAGE, D.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K. R.; FREITAS, N. H.; SIMÕES, Z. L.; SILVA, I. C.; TEIXEIRA, É. W. Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p. 59, 2011.

MILONE, J. P.; CHAKRABARTI, P.; SAGILI, R. R.; TARPY, D. R. Colony-level pesticide exposure affects honey bee (*Apis mellifera* L.) royal jelly production and nutritional composition. *Chemosphere*, v. 263, p. 128183, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128183>.

MOMMAERTS, V.; PLATTEAU, G.; BOULET, J.; STERK, G.; SMAGGHE, G. *Trichoderma*-based biological control agents are compatible with the pollinator *Bombus terrestris*: A laboratory study. **Biological Control**, v. 46, n. 3, p.463-466, 2008.

MOREIRA, L.; FARINHA, N. **Guia Prático da Biologia da Abelha**. Lisboa: Fnep - Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2011. 48 p.

MOREIRA, S. B. L. C.; QUEIROZ, G. S.; CASTRO, H. A. de; SOUZA, E. A. de; PEREIRA, D. S.; HOLANDA NETO, J. de. Infestação do ácaro *Varroa destructor* em colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no Semiárido potiguar, Nordeste do Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 1, p.143-149, 2017.

NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, Y.; SHIRAISHI, A.; KOBAYASHI, S.; HARADA, M.; YOSHIYAMA, M.; OSAKI, M.; OKURA, M.; TAKAMATSU, D. Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 14 set. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33329>.

OECD. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*. 1998;(Setembro):1–13.

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

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera*

(Hymenoptera: apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.21842>

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

PEDRAS, M. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v.59, n.6, p.579-596, 2002

PERERA, S.; KARUNARATNE, I.. Floral visits of the wild bee, *Lithurgus atratus*, impact yield and seed germinability of okra, *Abelmoschus esculentus*, in Sri Lanka. **Journal of Pollination Ecology**, v. 25, p. 1-6, 10 fev. 2019.. [http://dx.doi.org/10.26786/1920-7603\(2018\)20](http://dx.doi.org/10.26786/1920-7603(2018)20).

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. DE M.; LOPES, M. T DO R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, H. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p.422-442, 2016.

POSADA-FLOREZ, F.; RYABOV, E. V.; HEERMAN, M. C.; CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SONENSHINE, D. E.; COOK, S. C. *Varroa destructor* mites vector and transmit pathogenic honey bee viruses acquired from an artificial diet. **Plos One**, v. 15, n. 11, p. 1-10, 24 nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0242688>.

POTTS, S.; BIESMEIJER, K.; BOMMARCO, R.; BREEZE, T.; CARVALHEIRO, L.; FRANZÉN, M.; GONZÁLEZ-VARO, J.P.; HOLZSCHUH, A.; KLEIJN, D.; KLEIN, A.-M.; KUNIN, B.; LECOCQ, T.; LUNDIN, O.; MICHEZ, D.; NEUMANN, P.; NIETO, A.; PENEV, L.; RASMONT, P.; RATAMÄKI, O.; RIEDINGER, V.; ROBERTS, S.P.M.; RUNDLÖF, M.; SCHEPER, J.; SØRENSEN, P.; STEFFAN-DEWENTER, I.; STOEV, P.; VILÀ, M.; SCHWEIGER, O. **Status and trends of European pollinators: Key findings of the STEP project**. Sofia: Pensoft Publishers, 2015. 76 p.

POTRICH, M.; LIBARDONI, G.; ALVES, L. F. A.; PIETROWSKI, V.; SILVA, E. R. L.; NEVES, P. M. O. J. Is *Isaria fumosorosea* selective to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)? **European Journal of Entomology**, v. 117, p. 110-117, 5 mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.14411/eje.2020.012>.

POTRICH, M.; SILVA R. T. L DA; COSTA-MAIA, F. M.; LOZANO; ROSSI, R. M.; COLOMBO, F. C; TEDESCO, F. G.; GOUVEA, A. de. Effect of entomopathogens on Africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p.23-28, 2018.

PRENDERGAST, K.; LECLERCQ, N.; VEREECKEN, N. J. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) out number native bees in Tasmanian apple orchards. **Austral Entomology**, v. 60, n. 2, p. 422-435, 3 fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/aen.12521>.

R CORE TEAM. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAES, H.; VERBEKE, M; MEULEMANS, W; COSTER, W. D. Organization and ultrastructure of the regenerative crypts in the of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **Tissue and Cell**, v. 26, n. 2, p.231-238, 1994.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 327-333, jun. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.002>.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. de. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 10, p.1-21, 2017.

RAYMANN, K.; MOTTA, E. V. S.; GIRARD, C.; RIDDINGTON, I. M.; DINSE, J. A.; MORAN, N. A. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p.1-13, 2018.

REINALDO, H.S.; OLIVEIRA, R. de; SOUZA, M..dos S. de; NASCIMENTO, I.N. do; NASCIMENTO JÚNIOR, J.L. do; BATISTA, J. de L. Controle do pulgão da erva-doce *Hyadaphis foeniculi* e seletividade em abelhas *Apis mellifera*. **Pesquisagro**, v. 1, n. 1, p. 18-27, 2019. <http://dx.doi.org/10.33912/agro.2596-0644.2018.v1.n1.p18-27.id210>.

RENZI, M. T., AMICHOT, M., PAURON, D., TCHAMITCHIAN, S., BRUNET, J. L., KRETZSCHMAR, A., 445 MAINI. S.; BELZUNCES, L. P. Chronic toxicity and physiological changes induced in 49 446 the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or 447 combined. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 205-213, 2016.

ROCHA, J.S.; **Apicultura**. Programa Rio Rural. Niterói – RJ. 27f. 2008.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Ed. Roca. 1996. 1028p.

SAMNEGÅRD, U. Why is arabica coffee visited by so few non- *Apis* bees in its native range? **Ecology**, v. 101, n. 9, p. 1-8, 8 jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/ecy.3103>.

SANTOS, M. E. C.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L. de; PIMENTEL, L. D. Características físicas do maracujá-azedo em função do genótipo e massa do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p.1102-1110, 2009.

SARDAS, M. A.; KARAB YdK,  .; ETI, S.; KARGd, S. P. Boron Applications and Bee Pollinators Increase Strawberry Yields. **International Journal of Fruit Science**, v. 21, n. 1, p. 481-491, 1 jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2021.1907010>.

SCHNEIDER, C. W.; TAUTZ, J.; GRÜNEWALD, B.; FUCHS, S. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012

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

SOARES, J. M.; TANWIR, S. E.; GROSSER, J. W.; DUTT, M. Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and Huanglongbing. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 237-250, 25 maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-020-00362-9>.

STRAUB, L.; VILLAMAR-BOUZA, L.; BRUCKNER, S.; CHANTAWANNAKUL, P.; GAUTHIER, L.; KHONGPHINITBUNJONG, K.; RETSCHNIG, G.; WILLIAMS, G. R. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1835, p. 1-8, 2016.

TAILLEBOIS, E.; CARTEREAU, A.; JONES, A. K.; THANY, S. H. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 151, p. 59-66, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>.

TESOVNIK, T.; ZORC, M.; GREGORC, A.; RINEHART, T.; ADAMCZYK, J.; NARAT, M. Immune gene expression in developing honey bees (*Apis mellifera* L.) simultaneously exposed to imidacloprid and *Varroa destructor* in laboratory conditions. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 5, p. 730-739, 4 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2019.1634463>.

THANY, S.; BOURDIN, C.M.; GRATON, J.; LAURENT, A.D.; MATH -ALLAINMAT, M.; LEBRETON, J.; QUESTE, J.Y.L. 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.

THEODORAKI, E.; TEREZAKI, A.; HARIZANIS, P.; KYRIAZI, M.; ROUSSIS, V.; PAPAIOANNOU, G.; PAPAGEORGIADI, M.; GRIGOROPOULOS, M.; RALLIS, M. Potential Healing Properties of Bee Products to Thermal and Sun Burns. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p.1-10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.242>.

THERNEAU T. 2015. A Package for Survival Analysis in S_.version 2.38, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.

TIAN, J.; ROMEIS, J.; LIU, K.; ZHANG, F.; ZHENG, X.; XU, H.; CHEN, G.; HE, X.; LU, Z. Assessing the effects of Cry1C rice and Cry2A rice to *Pseudogonatopus flavifemur*, a parasitoid of rice planthoppers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 10 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08173-w>.

TIAN, J.; ZHANG, Q.; AN, X.; LIU, H.; LIU, Y.; LIU, H. Molecular Dynamics Simulations Study on the Resistant Mechanism of Insects to Imidacloprid due to Y151-S and R81T Mutations in nAChRs. **Molecular Informatics**, v. 38, n. 8-9, p. 1800125, 11 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/minf.201800125>.

TISON, L.; RÖßNER, A.; GERSCHEWSKI, S.; MENZEL, R.. The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 139-145, set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.007>.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, R. A.; RUÍZ-TOLEDO, J.; TOLEDO, J.; SÁNCHEZ, D. Effect of Three Entomopathogenic Fungi on Three Species of Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 3, p. 1015-1019, 4 maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tow064>

TOMÉ, H. V. V.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; GUEDES, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103-109, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.

TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 9 nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15308-6>.

TSCHARNTKE, T. Disrupting plant-pollinator systems endangers food security. **One Earth**, v. 4, n. 9, p. 1217-1219, set. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.022>.

UNIPROT. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://www.usda.gov/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; WIEGERS, H.; ZWAAN, B. J.; KOENRAADT, C. J. M.;

VAN KAN, J. A. L. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 41-49, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>

VAN DER SLUIJS, J. P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 5, n. 3–4, p. 293–305, 2013.

VAN LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W. J.; RBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **Biocontrol**, v. 63, n. 1, p.39-59, 2017.

VANENGELSDORP, D.; JUNIOR HAYES, J.; UNDERWOOD, R.M.; PETTIS, J.S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p.7-14, 2010.

VANENGELSDORP, D.; TRAYNOR, K. S.; ANDREE, M.; LICHTENBERG, E. M.; CHEN, Y.; SAEGERMAN, C.; COX-FOSTER, D. L. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. **Plos One**, v. 12, n. 7, p.1-10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179535>

VEGA, F. E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. **Insect Pathology**, p.171-220, 2012

VINÍCIUS-SILVA, R.; PARMA, D. de F.; TOSTES, R. B.; ARRUDA, V. M.; WERNECK, M. do V. Importance of bees in pollination of *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) in open-field of the Southeast of Minas Gerais State, Brazil. **Hoehnea**, v. 44, n. 3, p.349-360, 2017.

VIVEKANANDHAN, P.; SWATHY, K.; KALAIMURUGAN, D.; RAMACHANDRAN, M.; YUVARAJ, A.; KUMAR, A. N.; MANIKANDAN, A. T.; POOVARASAN, N.; SHIVAKUMAR, M. S.; KWEKA, E. J. Larvicidal toxicity of *Metarhizium anisopliae* metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. **Plos One**, v. 15, n. 5, p. 1-10, 4 maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232172>.

WANG, Y.; DAI, P.; CHEN, X.; ROMEIS, J.; SHI, J.; PENG, Y.; LI, Y. Ingestion of Bt rice pollen does not reduce the survival or hypopharyngeal gland development of *Apis mellifera* adults. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 1243-1248, 7 nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3647>.

WAKGARI, M.; YIGEZU, G. Honeybee keeping constraints and future prospects. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1872192, 2021. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2021.1872192>.

WALDSCHMIDT, A. M.; LOPES, L. A.; MARCO JR., P.; CAMPOS, L. A. O. Genetics of *Euglossini* bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic Forest in the region of

Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 3, p.541-549, 2005.

WINSTON, M.L. A biologia da Abelha. Tradução de Carlos A. Osowski - PORTO ALEGRE: **Magister**, 276p. 2003.

WOLFF, L. F.; REIS, V. D. A. DOS; SANTOS, R. S. S. DOS. **Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2008.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p. 71-126, 11 jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.2174/1874437001408010071>.

WU, P.; TSCHARNTKE, T.; WESTPHAL, C.; WANG, M.; OLHNUUD, A.; XU, H.; YU, Z.; WERF, W. v. D.; LIU, Y. Bee abundance and soil nitrogen availability interactively modulate apple quality and quantity in intensive agricultural landscapes of China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 305, p. 107168, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2020.107168>.

XIE, Z.; WANG, J.; PAN, D.; AN, J. Landscape-modified concentration effect and waylaying effect of bees and their consequences on pollination of mass-flowering plants in agricultural ecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 280, p. 24-34, ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.023>.

YONGSAWAS, R.; CHAIMANEE, V.; PETTIS, J. S.; BONCRISTIANI JUNIOR, H. F.; LOPEZ, D.; IN-ON, A.; CHANTAWANNAKUL, P.; DISAYATHANOOWAT, T. Impact of Sacbrood Virus on Larval Microbiome of *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Insects**, v. 11, n. 7, p. 439, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11070439>.

YOUSEFI, B.; FOUKS, B. The presence of a larval honey bee parasite, *Ascosphaera apis*, on flowers reduces pollinator visitation to several plant species. **Acta Oecologica**, v. 96, p. 49-55, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actao.2019.03.006>.

ZHANG, B.; ZOU, C.; HU, Q. Effects of *Isaria fumosorosea* on TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) Accumulation and Transmitting Capacity of *Bemisia tabaci*. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1-13, 7 out. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0164356>.

ZHANG, Z. Y.; LI, Z.; HUANG, Q.; YAN, W. Y.; ZHANG, L. Z.; ZENG, Z. J. Honeybees (*Apis mellifera*) modulate dance communication in response to pollution by imidacloprid. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 2, p. 477-482, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2020.03.011>.

ZHAO, Q.; YE, L.; WANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, Y.; KEYHANI, N. O.; HUANG, Z. Sustainable control of the rice pest, *Nilaparvata lugens*, using the entomopathogenic

fungus *Isaria javanica*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 3, p. 1452-1464, 28 nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.6164>.

ZHU, C.; NIU, Y.; ZHOU, Y.; GUO, J.; HEAD, G. P.; PRICE, P. A.; WEN, X.; HUANG, F. Survival and effective dominance level of a Cry1A.105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on common pyramided Bt corn traits. **Crop Protection**, v. 115, p. 84-91, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2018.09.008>.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865-901, dez. 2008. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150802471812>.