

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

RITA TATIANE LEÃO DA SILVA

DISSERTAÇÃO

**EFEITO DE ENTOMOPATÓGENOS E EXTRATOS VEGETAIS SOBRE
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

**DOIS VIZINHOS
2014**

RITA TATIANE LEÃO DA SILVA

**EFEITO DE ENTOMOPATÓGENOS E EXTRATOS VEGETAIS SOBRE
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa
Co-orientadores: Prof^a. Dra. Michele Potrich
Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

**DOIS VIZINHOS
2014**

S586e Silva,Rita Tatiane Leão da.
Efeito de entomopatógenos e extratos vegetais sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). – Dois Vizinhos: [s.n], 2014.
103 f.;il.

Orientador: Alfredo de Gouvea.
Co-orientadora: Michelle Potrich.
Co-orientador: Everton Ricardi Lozano da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de pós-graduação em Zootecnia. Dois Vizinhos, 2014.
Inclui bibliografia

1.Abelhas 2.Polinizadores I.Gouvea, Alfredo de, orient. II. Potrich, Michelle ,co-orient. III.Silva, Everton Ricardi Lozano da,co-orient.IV.Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V.Título

CDD: 595.799



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Câmpus Dois Vizinhos

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 030

Efeito de entomopatógenos e extratos vegetais sobre *Apis mellifera* L.

(Hymenoptera: Apidae)

por

Rita Tatiane Leão da Silva

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

Banca examinadora:

Dr. Alfredo Gouvea
UTFPR

Dr. Everton Ricardi Lozano da Silvan
UTFPR

Dr. Daian Guilherme Pinto de Oliveira
UFFS

Visto da Coordenação: _____

Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado
UTFPR

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

"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

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos recebidas, por iluminar minhas escolhas e colocar pessoas especiais em meu caminho.

À minha família: esposo Erich Helfer Carvalho e minha filha Hellen Silva Carvalho pelo amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais Maria Célia Silva, Vilmar da Silva (im memória), e meus irmãos pelo apoio em toda a minha educação e trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Alfredo Gouvêa, pelas orientações, incentivo e amizade.

À Prof^a Dra. Michele Potrich, co-orientadora, pela amizade, apoio, incentivo, conselhos, comprometimento e principalmente pela atitude e agilidade na conclusão de todas as atividades pertinentes ao programa. Sempre serei grata por todo auxílio e amizade. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Everton Ricadi Lozano da Silva, pela co-orientação, pela amizade, incentivo e apoio em muitos momentos.

À Prof^a Dra. Fabiana Martins Costa Maia, pelos esclarecimentos sobre as abelhas, auxílio na interpretação das análises estatísticas e por disponibilizar a equipe da UNEPE Apicultura na coleta das abelhas.

Ao Prof. Dr. Edgar S. Vismara e Prof. Dr. Robson Rossi, pelas orientações e auxílio nas interpretações das análises estatísticas.

Ao professor Dr. Fernando Sousa pela disponibilidade e orientações com as análises histológicas.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico, Aline Mara Telles, Sidinei Dallacort, Flávia Tedesco, Cleverson de Sousa, Matheus Padilha e Jackeline Lima pela amizade, companheirismo e auxílio fundamental na condução do experimento. Em especial a Dieli Simionatto, pelas orientações, disponibilidade, amizade e pela ajuda na execução deste trabalho.

À mestrande Jackelinny Ravanelli Martins pelas orientações sobre as abelhas, bem como os demais graduandos do grupo GpmApis que também auxiliaram nas coletas das abelhas operárias.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Dois Vizinhos/PR em nome do Diretor Geral Prof. Dr. Alfredo Gouvêa, Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação Prof. Dr. Luis Fernando Glasenapp de Menezes e Coordenador do

Mestrado em Zootecnia Prof. Dr. Ricardo Sado.

À Fundação Araucária pelo incentivo financeiro, fundamental na realização do experimento.

A todas demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e colaboraram para a conquista deste objetivo.

Obrigado

RESUMO

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Efeito de entomopatógenos e extratos vegetais sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

Escassas são as informações sobre os efeitos dos entomopatógenos e extratos vegetais sobre organismos não alvos, como os polinizadores, em especial as abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de micro-organismos entomopatogênicos e extratos vegetais sobre *A. mellifera*. Para isto, os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metarril® WP) *Beauveria bassiana* (Boveril® WP) e *Bacillus thuringiensis* subespécie *Kurstaki* (Thuricide® WP) e os extratos vegetais de Romã (*Punica granatum* L.), Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*), Manjerona (*Origanum majorana* L.), Camomila (*Matricaria recutita* L.) foram avaliados sobre as operárias de *A. mellifera* em quatro diferentes formas de aplicação: 1- pulverização direta dos tratamentos sobre as abelhas operárias; 2- contato em superfície vítrea pulverizada com os tratamentos; 3- contato com as folhas de soja imersas na solução dos tratamentos e 4- misturando-se os tratamentos na pasta Cândi. Para as respectivas testemunhas utilizou-se água destilada esterilizada e pasta Cândi pura. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com 20 abelhas por repetição, estas foram acondicionadas em caixa gerbox e posteriormente em câmara climatizada tipo B.O.D. (27 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, fotofase de 12 h). A mortalidade/sobrevivência das operárias foi avaliada a partir de uma hora até às 240 horas, sendo os dados submetidos ao procedimento Bayesiano. As operárias mortas pela ingestão de pasta Cândi contaminada foram separadas e selecionadas aleatoriamente para a retirada do mesêntero (ventrículo) e posterior análise histológica. Os mesmos foram avaliados quanti e qualitativamente. Os produtos Boveril®, Metarril® e Thuricide® e os extratos vegetais de Manjerona, Camomila, Romã e Chapéu-de-couro reduziram a sobrevivência das operárias de *A. mellifera*. Verificou-se que o produto Boveril® e o extrato vegetal de Manjerona reduziram a sobrevivência das operárias de *A. mellifera* em todos os bioensaios realizados. Os tratamentos com os produtos biológicos comerciais Boveril® e Thuricide® provocaram alterações morfológicas no mesêntero de *A. mellifera*, quando alimentadas com pasta Cândi incorporada com esses produtos. Os extratos vegetais Manjerona e Romã causaram modificações morfométricas, reduzindo o comprimento de células do mesêntero de *A. mellifera*, mas sem causar alterações morfológicas. Estes resultados fornecem informações importantes para o manejo dos insetos-pragas com o intuito de preservar os agentes polinizadores.

Palavras-chave: Abelhas. Entomopatógenos. Organismo não-alvo. Seletividade.

ABSTRACT

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Effect of entomopathogens and plant extracts on *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

Information on the effects of plant extracts and entomopathogens on non-target organisms such as pollinators, especially bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) are scarce. In this sense, the present work aimed to evaluate the effect of entomopathogenic microorganisms and plant extracts on *A. mellifera*. For this, the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* (Metarril[®] WP), *Beauveria bassiana* (Boveril[®] WP) and *Bacillus thuringiensis* subspecies Kurstaki (Thuricide[®] WP) and plant extracts of Romã (*Punica granatum* L.), Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*), Manjerona (*Origanum majorana* L.), Camomila (*Matricaria recutita* L.) were evaluated on the workers of *A. mellifera* in four different forms of application: 1 - direct spray of treatments on the worker bees; 2- contact in a glass surface sprayed with the treatments; 3- contact with soybean leaves immersed in the solution treatments and 4- mixing the treatments in a paste Candi pure. For the respective controls it has been used sterile distilled water and paste Candi pure. Each treatment consisted of five replicates, with 20 bees per replication, and these were placed in Gerboxes and later in a climate chamber type B.O.D. (27 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, photoperiod of 12 h). The mortality / survival of the workers were assessed from one hour to 240 hours, and the data submitted to the Bayesian procedure. The workers bee killed by the ingestion of contaminated Candi paste were separated and randomly selected for the withdrawal of the midgut (ventricle) and subsequent histological analysis. The same quality and quantity have been assessed. The products Boveril[®], Metarril[®] and Thuricide[®] and the plant extract of Manjerona, Camomila, Romã e Chapéu-de-couro have decreased the survival of *A. mellifera* workers. It has been found that the product Boveril[®] and the plant extract of Manjerona have reduced the survival of *A. mellifera* workers in all bioassays performed. The treatments with the biological commercial products Boveril[®] and Thuricide[®] caused morphological changes in the midgut of *A. mellifera*, when they were fed with Candi paste incorporated to these products. The plant extracts of Manjerona and Romã caused morphological changes, reducing the length of the midgut cells of *A. mellifera*, but without causing morphological changes. These results provide important information for the management of insect pests in order to conserve pollinator's agents.

Keywords: Bees. Entomopathogens. Non-target organism. Selectivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma secção longitudinal de uma operária de *Scaptotrigona postica* mostrando o sistema digestório. f=faringe; E=esôfago; pa=papo; V=ventrículo; pi=piloro; if=intestínofino; r=reto; TM=túbulo de Malpighi ... 51

Figura 2: Curva de sobrevivência (horas) de *A. mellifera*. A) Pulverização com os entomopatógenos, B) Contato em superfície contaminada com os entomopatógenos, C) Contato com folhas de soja contaminadas com os entomopatógenos e D) Ingestão de pasta cândi misturada com os entomopatógenos, teste de sobrevivência Kaplan-Meier vs Weibull ajustadas aos tempos (horas). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$ 59

Figura 3: Fotomicrografia (microscópio de luz Opton trinocular tnb-40t-pl, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 10x) do mesêntero (ventrículo) de *A. mellifera* alimentadas com: A) Pasta cândi pura; B) Pasta cândi e Tween[®] WP, C) Pasta cândi e Thuricide[®] WP, D) Pasta cândi e Boveril[®] WP e E) Pasta cândi e Metarril[®] WP. ca: cobertura amorfa; cp: células principais; cr: ninhos de células regenerativas; M: musculatura circular..... 61

Figura 4: Representação esquemática de uma secção longitudinal de uma operária de *Scaptotrigona postica* mostrando o sistema digestório. f=faringe; E=esôfago; pa=papo; V=ventrículo; pi=piloro; if=intestínofino; r=reto; TM=túbulo de Malpighi.... 81

Figura 5: Curva de sobrevivência (horas) de *A. mellifera*. A) Pulverização dos extratos vegetais B) Contato com folhas de soja contaminadas com os extratos vegetais e C) Ingestão de pasta cândi misturada com os extratos vegetais, teste de sobrevivência Kaplan-Meier vs Weibull ajustadas aos tempos (horas). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$ 89

Figura 6: Fotomicrografia do mesêntero (ventrículo) de *A. mellifera* (microscópio de luz opton trinocular tnb-40t-pl, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de $10 \times$) alimentadas com: A) Pasta cândi e Romã; B)

Pasta cândi e Manjerona; C) Pasta cândi pura; D) Pasta cândi e Camomila e E) Pasta cândi e Chapéu-de-couro..... 91

Figura 7: Análise cromatográfica (CLAE) do extrato de: A) Camomila, B) Romã, C) Manjerona e D) Chapéu-de-Couro. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR, 2014..... 92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Tempo letal (50%) de sobrevivência (Mediana) (Média \pm DP) de operárias de *Apis mellifera* (Estimativas Bayesianas do parâmetro de forma do modelo Weibull). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2014..... 58
- Tabela 2- Comprimento (μm) (\pm EP) das células do mesêntero (ventrículo) de operárias de *Apis mellifera* após alimentação com pasta Cândi misturada com os entomopatógenos. Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014..... 60
- Tabela 3 - Nome comum, nome científico, família, e partes das plantas utilizadas para obtenção dos extratos vegetais avaliados nos bioensaios. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014..... 78
- Tabela 4- Tempo letal (50%) de sobrevivência (Mediana) (Média \pm DP) de operárias de *Apis mellifera* (Estimativas Bayesianas do parâmetro de forma do modelo Weibull). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2014..... 88
- Tabela 5 - Comprimento (μm) (\pm DP) das células do mesêntero (ventrículo) de operárias de *Apis mellifera* após alimentação com pasta Cândi misturada com os extratos vegetais. Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014..... 90

LISTA DE SIGLAS

B.O.D	Demanda Biológica de Oxigênio
Bt	<i>Bacillus thurigiensis</i>
°C	grau Celsius
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	dióxido de carbono
Cry	Proteínas Cristal
cm	Centímetros
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g	grama
H/E	Hematoxilina/Eosina
HPLC	High Performace/Pressure Liquid Chromatografy
h	hora
L	litro
mL	mililitro
mm	milímetros
µm	micrometro
UNEPE	Unidade de Ensino e Pesquisa
UTFPR/DV	Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Dois Vizinhos
U. R.	umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 SISTEMAS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO	18
2.2 CONTROLE ALTERNATIVO	19
2.2.1.1 Fungos Entomopatogênicos	20
2.2.1.2 Bactérias Entomopatogênicas	22
2.2.2 EXTRATOS VEGETAIS.....	24
2.2.2.1 Chapéu-de-couro <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltl.) Micheli Alismataceae	25
2.2.2.2 Camomila <i>Matricaria recutita</i> L. Asteraceae	26
2.2.2.3 Manjerona <i>Origanum majorana</i> L. Lamiaceae.....	26
2.2.2.4 Romã <i>Punica granatum</i> L. Punicaceae.....	27
2. 4 APICULTURA	27
2.4.1 Abelhas <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae).....	28
2.5 SELETIVIDADE DOS AGENTES DE CONTROLE SOBRE <i>A. mellifera</i>	29
REFERÊNCIAS.....	31
3 CAPÍTULO I - EFEITO DE ENTOMOPATÓGENOS SOBRE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE).	43
3.1 RESUMO	43
3.2 ABSTRACT	44
3.3 INTRODUÇÃO	45
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.4.1 Obtenção dos entomopatógenos:.....	47
3.4.2 Obtenção de <i>A. mellifera</i>	47
3.4.3 Bioensaio 1- Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	48
3.4.4 Bioensaio 2- Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em superfície vítrea.	49
3.4.5 Bioensaio 3- Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja.....	49
3.4.6 Bioensaio 4- Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Cândi sobre, <i>A. mellifera</i>	50
3.4.6.1 Análise histológica do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi incorporada com os entomopatógenos	51

3.4.7 Análises Estatísticas	52
3.5 RESULTADOS	56
3.5.1 Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	56
3.5.2 Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em superfície vítrea.....	56
3.5.3 Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja	56
3.5.4 Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Cândi, sobre <i>A. mellifera</i>	56
3.5.5 Análise histológicas do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi incorporada com entomopatógenos	60
3.6 DISCUSSÃO	62
3.6.1 Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	62
3.6.2 Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em superfície vítrea.....	63
3.6.3 Efeito dos entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja	64
3.6.4 Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Cândi, sobre <i>A. mellifera</i>	64
3.6.5 Análise histológicas do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi incorporada com entomopatógenos	66
3.6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
4.1 RESUMO	73
4.2 ABSTRACT	74
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	77
4.4.1 Obtenção de <i>A. mellifera</i>	77
4.4.2 Obtenção dos extratos vegetais para os bioensaios:.....	77
4.4.3 Bioensaio 1- Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	78
4.4.4 Bioensaio 2- Efeito dos extratos vegetais sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja.....	79
4.4.5 Bioensaio 3- Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Cândi sobre <i>A. mellifera</i>	80
4.4.6: Análise histológica do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi misturada com os extratos vegetais.	80
4.4.7 Análise Cromatográfica.....	82

4.4.8 Análises Estatísticas	83
4.5 RESULTADOS.....	87
4. 5.1 Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	87
4.5.2 Efeito dos extratos vegetais sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja	87
4.5.3 Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Cândi sobre <i>A. mellifera</i> .	87
4 5.4 Análise histológica do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi incorporada com extratos vegetais.....	90
4.5.5 Análise cromatográfica	92
.....	92
4.6 DISCUSSÃO	93
4. 6.1 Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>	93
4.6.2 Efeito dos extratos vegetais sobre <i>A. mellifera</i> , por contato em folhas de soja	93
4.6.3 Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Cândi sobre <i>A. mellifera</i> .	93
4. 6.4 Análise histológica do mesêntero de <i>A. mellifera</i> alimentadas com pasta Cândi incorporada com extratos vegetais.....	94
4.6.5 Análise cromatográfica	95
4.7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS.....	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

O ser humano utiliza há séculos a agricultura como meio para satisfazer suas necessidades alimentares e atualmente como fonte de renda. Todavia, a forma de plantio que se dava para a própria subsistência, a partir de 1950, foi substituída e, as práticas manuais deram lugar aos maquinários agrícolas e à utilização de insumos agrícolas como fertilizantes e inseticidas sintéticos.

No entanto, muitos problemas surgiram devido ao uso excessivo de inseticidas sintéticos, como a contaminação dos alimentos, desequilíbrios ambientais, populações de insetos resistentes, ressurgência de pragas (VENDRAMIM & CASTIGLIONE, 2000) e efeitos deletérios sobre organismos não alvos, tornando-se necessário a busca por técnicas que causem menor impacto ambiental, como o controle biológico e o controle alternativo.

O controle biológico é uma técnica aplicada à redução da população de insetos-praga e tem se apresentado eficiente e viável no manejo de insetos de várias culturas, por auxiliar na minimização dos impactos ambientais e muitas vezes ser vantajoso economicamente (COIMBRA & CAMPOS, 2005).

O controle alterantivo, por conseguinte, é um conjunto de métodos que tem por finalidade oferecer alternativas para reduzir o uso dos inseticidas sintéticos, também reduzindo os riscos de contaminação ao ambiente e à saúde humana (EMBRAPA, s.a). Neste tipo de controle utilizam-se produtos alternativos para o controle de doenças e pragas (LUCKMANN, 2013), sendo, frequentemente utilizados os extratos vegetais, caldas, produtos fitossanitários comerciais, óleos essenciais, podendo ser produzidos a partir de materiais obtidos nas propriedades rurais (EMBRAPA, 2004).

O Controle Biológico e o Controle Alterantivo são frequentemente utilizados nos sistemas alternativos e/ou orgânicos de produção, por serem métodos considerados mais seguros que os inseticidas sintéticos, por não serem considerados tóxicos ao homem e por não deixar resíduos no ambiente (OLIVEIRA; ÁVILA, 2010).

Embora os agentes biológicos de ocorrência natural e os extratos vegetais sejam considerados mais seguros e econômicos do que os inseticidas sintéticos, ainda assim podem provocar efeitos negativos sobre os organismos não alvos, associados aos cultivos agrícolas (SOSA-GÓMEZ et al. 1998).

Baseado na preocupação sobre os possíveis efeitos dos produtos alternativos sobre os organismos não alvos, Silva et al. (2007) em estudos realizados com *A. mellifera* e óleos de mamona (*Ricinus communis* L.), de neem (*Azadirachta indica*) e de soja (*Glycine max*), verificaram que esses produtos não afetaram a longevidade das operárias após 72 horas em contato com os óleos.

Ao avaliar o efeito da Rotenona (Rotenat[®] CE) sobre as operárias *A. mellifera*, verificou-se longevidade maior que 48 horas para 69,5% das abelhas pulverizadas (EFROM, 2009), esse mesmo autor verificou que o produto Pironat[®] adicionado à pasta Cândi, não interferiu na longevidade e sobrevivência das operárias de *A. mellifera*, assim como SIMIONATTO (2013), avaliou Natuneem[®], verificando que, este produto não interferiu na longevidade das operárias de *A. mellifera*.

Entre os organismos não alvos, que apresentam importância econômica e ambiental, destaca-se a abelha africanizada, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). As abelhas são reconhecidas como insetos benéficos por produzirem vários produtos de interesse ao ser humano, como mel, geleia real, própolis e principalmente por realizarem a polinização de uma infinidade de plantas (COSTA-MAIA; LOURENÇO; TOLEDO, 2010). Pelo fato dessas abelhas serem exímias polinizadoras, elas, frequentemente, visitam culturas que foram manejadas e receberam tratamentos fitossanitários. Neste contato com os tratamentos, elas podem se contaminar e morrer, ou ainda, carregar o contaminante para dentro da colônia. Como os pequenos agricultores e os agricultores familiares normalmente apresentam apiários em suas propriedades e empregam, geralmente, o controle biológico e/ou o controle alternativo para o controle de insetos praga das culturas, é importante avaliar o possível efeito que estes produtos podem ocasionar sobre as abelhas *A. mellifera*, organismo não alvo. Apesar de diversos autores discorrerem sobre o efeito dos produtos biológicos e alternativos sobre os insetos-pragas, ainda são poucas as pesquisas enfatizando seus efeitos sobre os insetos úteis, em especial os polinizadores, como *A. mellifera*. Diante disto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de micro-organismos entomopatogênicos e extratos vegetais sobre *A. mellifera*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando a cada ano, como um dos países com maior produção agrícola e conseqüentemente, a demanda por inseticidas sintéticos utilizados para controlar os insetos-pragas também vem aumentando. Em contrapartida, a preferência dos consumidores por produtos sem resíduos químicos (resíduos de inseticidas sintéticos) vêm se destacando. Neste contexto, o sistema de produção convencional está perdendo espaço para os sistemas alternativos de produção. Com a implementação dos sistemas alternativos de produção, reduzem-se os riscos de poluição e de intoxicação dos agricultores e dos consumidores, estando na agricultura orgânica e/ou alternativa uma possibilidade de reduzir o uso de inseticidas sintéticos na produção agrícola (DINIZ, et al. 2006).

Os sistemas alternativos de produção caracterizam-se, principalmente, por não utilizarem inseticidas sintéticos e adubos químicos, utilizam tecnologias que respeitam os princípios ecológicos, primando pela preservação dos espaços naturais e conservação da biodiversidade (SANTOS et al., 2013).

Nesses sistemas, assim como em outros, é muito comum a presença de pragas e doenças nas culturas, sendo necessário utilizar produtos naturais e ou alternativos, como óleos, extratos vegetais, produtos alternativos comerciais, caldas, além da utilização de produtos biológicos (LUCKMANN, 2013).

Como observado entre os produtores da região sudoeste do estado do Paraná, que comumente utilizam caldas (86,9%), produtos alternativos (78,2%), predadores e parasitoides (13%) para o controle de insetos pragas (DALLACORT et al. 2013).

Conforme destacado, houve um aumento na procura por “produtos limpos”, e com isto o mercado de produtos orgânicos cresceu de forma significativa no Brasil e conseqüentemente cresceu o número de produtores de alimentos orgânicos. No ano de 2012 o país contava com cerca de 5,5 mil produtores de alimentos orgânicos, no ano de 2013, houve aumento de 22% em comparação com o ano anterior, totalizando 6.719 produtores e 10.064 unidades de produção orgânica em todo o país (MAPA, 2014).

Os sistemas alternativos de produção agroecológico concentram-se, principalmente em pequenas propriedades rurais, as quais procuram diversificar sua produção, investindo em diferentes tipos de produtos, como ocorre com os pequenos produtores paranaenses. As principais culturas produzidas no estado do Paraná são cana-de-açúcar, mandioca, frutas, trigo, milho, hortaliças e soja, sendo a produção desta última, concentrada na região sudoeste do estado (SEAB, 2014).

Além disso, é importante destacar que a produção apícola também se destaca como fonte de renda aos produtores orgânicos ou pequenos produtores. Em 2013 onde o setor apícola brasileiro exportou 16.180.566 toneladas de mel, gerando um montante de US\$ 54.123.900,00. Os estados brasileiros que se destacaram nas exportações são: São Paulo (4.415.937 toneladas), Rio Grande do Sul (3.733.628 toneladas), Santa Catarina (2.420.888 toneladas), Ceará (2.035.320 toneladas) e Paraná (2.059.817 toneladas) (ABEMEL, 2014).

2.2 CONTROLE ALTERNATIVO

O controle alternativo com a utilização de produtos de origem natural, como os extratos vegetais, produtos fitossanitários naturais, caldas e óleos essenciais apresentam potencial para o controle ou a repelência de insetos-pragas. Isto ocorre porque as plantas possuem suas próprias defesas, defendendo-se de outras plantas e de predadores, através de substâncias do metabolismo secundário (CROTEAU et al., 2000; PINTO et al., 2002).

2.2.1 Controle Biológico

O termo Controle Biológico foi denominado pela primeira vez em 1919, pelo pesquisador Harry S. Smith, indicando o uso de inimigos naturais para o controle de insetos-praga (MELO, 1998). A utilização do controle biológico se expandiu no fim do século XIX e início do século XX, mas com o uso intensificado e satisfatório dos inseticidas sintéticos as práticas de controle biológico foram sendo substituídas gradativamente (BARBOSA, 2004).

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação do número de animais e plantas por inimigos naturais, entre estes, destacam-se bactérias, vírus, fungos, parasitoides, predadores e nematoides. Os insetos mais utilizados para o controle biológico são os da ordem Hymenoptera e em menor quantidade os da ordem Diptera, Strepsiptera e Neuroptera (PARRA et al., 2002).

O controle biológico pode ser caracterizado como clássico, natural e aplicado. O controle biológico clássico consiste na importação e colonização de parasitoides ou predadores, visando ao controle de pragas exóticas. Neste caso o controle biológico é visto como uma medida de controle em longo prazo, pois a população dos inimigos naturais tende a aumentar com o passar do tempo e, portanto, somente se aplica a culturas semiperenes ou perenes (PARRA et al., 2002).

O controle biológico natural refere-se à população de inimigos que ocorrem naturalmente, os quais são responsáveis pela mortalidade natural no agroecossistema e pela manutenção de um nível de equilíbrio das pragas (PARRA et al., 2002). Por sua vez, o controle biológico aplicado caracteriza-se pela liberação de um agente de controle biológico em grande número, sendo produzidos de forma massal, visando ao controle da população de uma determinada (PARRA et al., 2002).

O controle biológico, em especial o controle microbiano trata-se da utilização de entomopatogênicos (bactérias, fungos, vírus, protozoários e nematoides) no controle de insetos-pragas em níveis que não causem prejuízos econômicos (GALLO et al., 2002).

Várias são as vantagens da utilização de controle microbiano como: especificidade; seletividade; controle associado a inseticidas sintéticos; não é tóxico para o homem e para os animais e, principalmente, mínimo impacto ambiental (ALVES et al., 2008).

No entanto, o controle biológico encontra alguns problemas no país, como a falta de estudos básicos relacionados à biologia, fisiologia, nutrição, relações hospedeiro/inimigo natural, análises de impacto ambiental (PARRA et al., 2002) e os possíveis efeitos sobre os insetos não alvos.

2.2.1.1 Fungos Entomopatogênicos

No controle microbiano, os fungos são utilizados, devido à capacidade de eliminação de populações de insetos e ácaros praga, podendo infectar vários hospedeiros, além de ser possível produzi-los *in vitro* e formulá-los (Leite et al., 2003).

Os fungos entomopatogênicos são mais vantajosos, pois podem causar epizootias que mantêm as pragas sob controle. Além disso, a infecção ocasionada pelos fungos entomopatogênicos ocorre devido a sua penetração através do tegumento do inseto, enquanto as bactérias, vírus e protozoários só penetram no inseto via oral (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998).

Após contato do inseto com o fungo, os esporos do fungo se aderem ao tegumento do inseto. Em seguida o esporo germina (12 a 18 horas), formando o grampo de penetração e o apressório. Este produz enzimas (lipases e proteinases) que rompem o tegumento do inseto, facilitando a penetração do fungo, após 72 h da inoculação o inseto encontra-se colonizado. Com a morte do inseto e o esgotamento de suas reservas, o fungo emite hifas pelas articulações e outras aberturas naturais do inseto morto produzindo conídios para iniciar outro ciclo de infecção (ALVES, 1998).

Os fungos podem controlar populações de insetos, ocorrendo naturalmente no ambiente (controle natural), quando utilizado como bioinseticida, requer cuidados especiais sendo adequado, ser aplicado no final da tarde, e, preferencialmente, logo após as chuvas, para que tenha umidade para se reproduzir (TONUS, 1999).

Existem diversas espécies de fungos entomopatogênicos que atuam na regulação de insetos praga, como os fungos dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Sporothrix*, em destaque para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

O fungo *B. bassiana* é empregado como agente de controle microbiano, sendo encontrado com frequência em insetos e amostras de solo (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001).

Já em condições laboratoriais podem colonizar a maioria dos insetos, em campo ocorrendo de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros e em ocorrências enzoóticas sobre dípteros, himenópteros e ortópteros (ALVES, 1998, ALVES, et al., 2002).

B. bassiana pode ser utilizado no controle do bicudo-de-algodeiro, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (ALMEIDA; ALBUQUERQUE; LIMA, 2005), do percevejo *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae), (BARBOZA et al., 2011),

do cascudinho *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) (SILVA et al., 2006; SANTORO et al., 2008).

O entomopatógeno *M.anisopliae* é um fungo cosmopolita (ONOFRE et al., 2002, DESTÉFANO, 2003). Este micro-organismo apresenta patogenicidade para mais de 204 espécies de insetos pertencentes a 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e outras (DESTÉFANO, 2003).

No Brasil, *M.anisopliae* está sendo empregado no controle biológico de cigarrinhas-das-pastagens *Deois flavopicta* Stal (Hemiptera: Cercopidae) (PEREIRA; BENEDETTI; ALMEIDA, 2008), da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (OLIVEIRA et al; 2008) e carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (SILVA et al., 2010). Este entomopatógeno também é utilizado no controle das cigarrinhas-das pastagens de forma inoculativa ou inundativa (ALVES et al., 2008).

Entre as principais vantagens da utilização do *M. anisopliae* no controle microbiano de insetos pragas está à facilidade de ser produzido em escala comercial, fácil de ser aplicado no campo, baixo custo por aplicação e, principalmente, mínimo impacto ambiental (ORLANDELLI & PAMPHILE, 2011).

Os fungos entomopatogênicos empregados para controlar insetos pragas embora sejam mais seguros que os produtos utilizados no controle convencional podem apresentar riscos ao ambiente, como por exemplo, provocar mortalidade em parasitoides, predadores e/ou polinizadores, como as abelhas *A. mellifera*.

2.2.1.2 Bactérias Entomopatogênicas

As bactérias entomopatogênicas são aquelas que causam doenças em insetos, sendo a mais importante *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bt) (GALLO et al., 2002). A bactéria *B. thuringiensis* apresenta características essenciais no controle de insetos-praga, tais como especificidade e seletividade (POLANCZYK & ALVES, 2003).

A bactéria *B. thuringiensis* é um bastonete, sendo Gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, esporulante e encontrada no solo (COSTA et al., 2010). A

produção de cristais é uma característica típica de *B. thuringiensis* e, ocorrendo durante a esporulação. Os cristais de *B. thuringiensis* são formados pelas proteínas Cristal (Cry) (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Esses cristais apresentam atividade entomopatogênica para insetos, das ordens dos Lepidópteros, Dípteros e Coleópteros (ANGÊLO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

O efeito inseticida ocasionado por *B. thuringiensis* inicia-se quando um inseto ingere os cristais protéicos (Cry) dessa bactéria, após a ingestão, são solubilizados pelo pH alcalino do trato intestinal do inseto. Essas toxinas se ligam em receptores específicos encontrados no epitélio do inseto, ocorrendo deformações nas células epiteliais do intestino médio e interrompendo seu funcionamento, o pH do fluido intestinal do inseto é reduzido, ocorrendo a liberação de nutrientes, os quais criam condições para a germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas da bactéria, ocorrendo a morte dos insetos por septicemia (KNOWLES; ELLAR, 1987; KNOWLES, 1994; ARONSON; SHAI, 2001).

Os produtos formulados a base de *B. thuringiensis* vem sendo utilizados em várias culturas, como tomate, algodão, citros, mandioca, soja, trigo, milho (GALLO et al., 2002), sendo utilizado para controlar a lagarta-mede-palmo *Trichoplusia ni* (Hübner) Lepidoptera: Erebinae, lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae, lagarta-falsa-medideira *Crysoideixys includens* (Walker) Lepidoptera: Noctuidae e traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) Lepidoptera: Gelechiidae (EMBRAPA, 2007).

Nas áreas agrícolas brasileiras, a formulação pó molhável de *B. thuringiensis* é muito utilizada, esse tipo de formulação proporciona um maior potencial no controle de insetos praga, sendo o entomopatógeno mais utilizado na cultura de soja orgânica no estado do Paraná (HIRAKURI et al., 2011).

As vantagens da utilização de *B. thuringiensis* está na produção massal, longa vida de prateleira, pode ser aplicado utilizando equipamentos convencionais e poucos efeitos em insetos-alvos. Entre as desvantagens, a baixa persistência no campo e influência das condições climáticas na efetividade do método (POLANCZYK; VALICENTE; BARREIRO, 2008).

Embora a bactéria de *B. thuringiensis* seja uma alternativa viável para controlar as pragas agrícolas, uma vez que seu uso é considerado mais seguro ao homem e ao meio ambiente, faz-se necessário, conhecer métodos adequados de aplicação desses

produtos sobre organismos não alvos, pois os mesmos podem atingir os esses insetos e ocasionar a morte.

Durante a coleta de pólen, néctar e água, as abelhas percorrem diferentes ambientes, muitas partículas como fungos e bactérias, podem se aderir ao corpo e serem ingeridas por esses insetos, o que possibilita a contaminação delas e de outras abelhas na colônia, levando à morte das mesmas (RIBEIRO, 2010).

2.2.2 EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais são substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas, não são essenciais para geração de energia para a planta, como as substâncias provenientes do metabolismo primário como os carboidratos, os lipídeos, os aminoácidos e os nucleotídeos (MANN, 1995; WIESBROOK, 2004).

Os metabólicos secundários agem como inseticidas, inibidores da alimentação (SAITO et al. 2004) e repelentes de insetos (FAZOLIN et al. 2002; MENEZES, 2005).

Os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais, são compostos secundários e são produzidos pelas plantas para sua sobrevivência (CASTRO, 2004). Esses princípios, após serem moídos podem ser extraídos em meio aquoso ou através de solventes orgânicos (WIESBROOK, 2004).

Os metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (LINCOLN; ZEIGER, 2013).

Os terpenoides possuem atividades supressoras de desenvolvimento e apetite de larvas de insetos, além de agir como agente de repelência (JÚNIOR, 2003). Já as saponinas, são tóxicas para herbívoros em geral (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

Entre os terpenos, os piretroides e os monoterpenos se destacam como ingredientes utilizados nos inseticidas comerciais, devido à baixa persistência, pouca toxicidade aos mamíferos e atividade inseticida (LINCOLN; ZEIGER, 2013).

Já os monoterpenos são encontrados em troncos e ramos de coníferas, sendo tóxicos para um grande número de insetos, principalmente para as espécies de besouro que são insetos praga dessas plantas, os compostos fenólicos agem na defesa contra

herbívoros e patógenos, entre esses compostos, tem-se os taninos e os flavonoides. Os taninos podem reduzir o crescimento e a sobrevivência de muitos herbívoros, atuando como repelente alimentar a vários animais. Os flavonoides apresentam propriedades anti-alimentares, esterilizantes (pela inibição do desenvolvimento ovariano) e inseticidas (VENZON et al., 2010).

Pesquisas visando avaliar a atividade inseticida/acaricida dos extratos vegetais têm sido desenvolvidas, afim, de identificar substâncias que afetam o comportamento e metabolismo dos insetos. Entre essas, as plantas das famílias Asteraceae (camomila) e Lamiaceae (manjerona), destacam-se por sua ação inseticida e/ou repelente (JÚNIOR, 2003).

Ao testar o efeito de extratos vegetais sobre as operárias de *A. mellifera*, Xavier (2009) verificou que o produto Rotenat[®] CE (composto natural presente na planta Derris spp. Leguminosae) causou mortalidade em 33% após exposição ao produto, entretanto, o mesmo produto não foi tóxico à abelha *Nonnotrigona testaceicornis* (Lepetier) (Hymenoptera: Apidae).

Ao avaliar o efeito tóxico da Rotenona (Rotenat[®] CE) sobre as operárias *A. mellifera*, Efrom (2009), verificou longevidade maior que 48 horas para 69,5% das abelhas pulverizadas com o produto.

Faz-se necessário identificar os possíveis efeitos dos extratos vegetais e/ou produtos alternativos, antes de serem aplicados sobre os organismos não alvos, como as operárias *A. mellifera*.

2.2.2.1 Chapéu-de-couro *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli Alismataceae

A planta chapéu-de-couro é oriunda do sul do Brasil se estendendo a Argentina. No entanto, pouquíssimas informações são encontradas sobre seu cultivo e efeito sobre os insetos-pragas. Os principais grupos de princípios ativos identificados na planta são alcaloides, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos (CORREA JUNIOR et al., 1994).

O principal componente ativo presente no chapéu-de-couro é um diterpeno, chamado de "echinodol" (ácido echinóico), obtido através de extração metanólica de folhas secas da planta, à baixa temperatura (MANNIS & HARTMANN; 1993).

Sanagiotto et al. (2013), verificaram que o extrato vegetal de Chapéu-de-couro, não afetou a porcentagem de ninfas eclodidas, não apresentando, portanto, efeito ovicida para *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera : Pentatomidae).

2.2.2.2 Camomila *Matricaria recutita* L. Asteraceae

A camomila é oriunda da Europa (zona dos Bálcãs), norte da África e Ásia Ocidental, sendo cultivada em toda a América. É comum encontrá-la em terrenos baldios e jardins, lugares em que tende a disseminar rapidamente como planta invasora (ALONSO, 1998).

Os constituintes químicos da planta, em especial do óleo essencial, estão localizados principalmente nos canais secretores e glândulas multicelulares individuais, situados na flor e no receptáculo. Cerca de 120 constituintes químicos foram identificados na camomila como metabólitos secundários, incluindo 28 terpenoides, 36 flavonoides e 52 compostos adicionais com potencial atividade farmacológica. (MANN; STABA, 1986).

Na família Asteraceae, encontram-se compostos fenólicos que apresentam atividade inseticida, pois espécies de Lepidoptera, Orthoptera e Hymenoptera, com sistema digestivo alcalino, foram sensíveis à ingestão desses compostos em dietas artificiais (CINTRA et al., 2002)

2.2.2.3 Manjerona *Origanum majorana* L. Lamiaceae

Esta é uma planta da região do Mediterrâneo, conhecida por seus usos medicinais.

Os principais constituintes do óleo de manjerona são sabineno, alpha terpineno, gamma terpineno, cimeno, terpinoleno, linalol, hidrato sabineno, acetato de linalyl, terpineol e gamma terpineol.

2.2.2.4 Romã *Punica granatum* L. Punicaceae

A Romã, originária da Ásia e espalhada em toda a região do Mediterrâneo, sendo cultivada em quase todo mundo, inclusive no Brasil (LORENZI; MATOS, 2008).

Os principais componentes ativos presente na Romã os taninos (substâncias polifenólicas) e alcaloides, substâncias dotadas de ação antimicrobiana (PEREIRA et al., 2005).

Pande & Akoh (2009) avaliaram a capacidade antioxidante e o perfil lipídico da romã, foi encontrado na casca maior teor de taninos hidrolisáveis. Em geral, a capacidade antioxidante foi encontrada em folhas, seguido da casca, polpa e sementes.

Gandhi et al. (2010) prepararam pós de folhas de *P. granatum* e *Murraya koenigii* (Curry indiano), testando efeito inseticidas sobre o besouro *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae), observando que para ambas espécies, a maior eficiência foi constatada na dose de 1 grama, causando 82% de mortalidade em média.

Apesar dos produtos naturais serem mais seguros que os inseticidas sintéticos ressaltam-se o seu potencial em apresentar efeito sobre organismos não alvos associados às culturas (SILVA, 2010), principalmente os polinizadores, como as abelhas *A. mellifera*.

2. 4 APICULTURA

A apicultura no Brasil teve início com a introdução das abelhas europeias *Apis mellifera*, porém, avançou com o auxílio das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* Lepelletier em 1956, culminando com o início da comercialização do mel, passando a ser realizada em todo território nacional (SOUZA, 2004). É considerada uma alternativa de subsistência para o agricultor familiar, permitindo a melhoria da qualidade de vida dos produtores e por não causar danos ao meio ambiente (FREITAS et al., 2004).

Esta atividade contribui com a sustentabilidade das pequenas propriedades, oportunizando emprego direta ou indiretamente no manejo com as abelhas, sendo mais vantajosa para as pequenas propriedades, pois necessita de pequenas áreas, de

instalações artesanais e de pouca mão de obra para manejar as abelhas (VARGAS, 2006).

A apicultura é uma atividade que corresponde ao tripé da sustentabilidade: o social, o econômico e o ambiental. Social por propiciar a fixação do homem no meio rural, econômica por ser uma alternativa para a diversificação da propriedade rural e aumento da rentabilidade, e é uma atividade de grande importância ambiental, pois contribui para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes (SILVA; PEIXE, 2012), sendo de suma importância a preservação das abelhas *A. mellifera*.

2.4.1 Abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

Em 1939 abelhas alemãs *Apis mellifera mellifera* (Hymenoptera: Apidae) foram introduzidas no Brasil com o auxílio dos imigrantes europeus, no século XIX, estes trouxeram junto com os seus pertences as abelhas europeias (CAMARGO, 1972), tais como *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera ligustica* (NOGUEIRA-NETO, 1972). No ano 1956, abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) foram trazidas da África pelo pesquisador Dr. Warwick Estevan Kerr, que desejava melhorar a apicultura brasileira. No entanto, 26 destas colônias enxamearam e cruzaram com espécies aqui existentes, dando origem às abelhas africanizadas (PEREIRA; LOPES, 2011).

As abelhas africanizadas são consideradas responsáveis pelo desenvolvimento apícola do Brasil, sabidamente conhecidas pela alta produção, pela rusticidade, rápido desenvolvimento e polinização eficiente (GONÇALVES, 2006).

As visitas das abelhas às flores de espécies nativas e agrícolas garantem a polinização (aumento na produção e qualidade de frutos e sementes), a regeneração e a perpetuação das espécies (PEGORARO; ZILLER, 2003), sendo as abelhas responsáveis por quase 80% da polinização das plantas cultivadas do planeta, 19% são por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por pássaros e 4% por borboletas e mariposas (FAO, 2004).

As ações dos agentes polinizadores, principalmente as abelhas, constituem dois processos de extrema importância, contribuindo com a produtividade das culturas agrícolas e com perpetuação de muitas espécies nativas (SOUZA; KADRI; ORSI, 2010).

2.5 SELETIVIDADE DOS AGENTES DE CONTROLE SOBRE *A. mellifera*

A seletividade pode ser entendida, quando o inseticida sintético seleciona e/ou controla o inseto-praga, não afetando, os inimigos naturais (YAMAMOTO & BASSANEZI, 2003).

O uso de produtos alternativos favorece a conservação dos inimigos naturais, sendo adequado utilizar inseticidas sintéticos eficientes no controle dos insetos-praga e seletivos aos inimigos naturais. A seletividade pode ser classificada em seletividade ecológica e fisiológica. A seletividade fisiológica, diz respeito ao uso de inseticidas que sejam mais tóxicos à praga do que a seus inimigos naturais, buscando minimizar a exposição do inimigo natural ao inseticida (PEDIGO, 1999).

Já a ecológica relaciona-se a formas de utilização dos inseticidas de modo a reduzir a exposição do inimigo natural ao inseticida sintético (PEDIGO, 1999), fazendo com que o produto químico atinja apenas a praga (GALLO et al., 2002).

A seletividade é uma das principais características para a escolha dos produtos a serem aplicados, sendo a ausência dessa característica uma das limitações de sua utilização nos sistemas alternativos de produção (XAVIER, 2009).

Alguns estudos foram realizados, a fim de identificar a seletividade de produtos biológicos comerciais sobre as operárias de *A. mellifera*. Brighenti et al. (2007) constataram a toxicidade de *B. thuringiensis* (Dipel[®]) sobre as abelhas de *A. mellifera*, após pulverização sobre as abelhas na concentração de 0,25g/100mL, verificando a ocorrência de 62,2% de mortalidade.

O produto Thuricide[®] (BtK) quando pulverizado na concentração recomendada, não interferiu na longevidade (66,67 horas) de operárias de *A. mellifera* (SIMIONATTO, 2013).

Extratos vegetais também foram avaliados sobre as operárias de *A. mellifera*, sendo encontrados diferentes efeitos sobre essas abelhas. Malerbo-Souza et al. (2003) verificaram que, quando pulverizados na cultura de maracujá e/ou em tubos de propileno, citronela (*Cymbopogon winterianus*) e orégano (*Origanum vulgare*) na concentração de 5% de glicerina, água e óleo não apresentaram efeito repelente para as abelhas *A. mellifera*.

Ao avaliar a seletividade de neem (dosagem recomendada), Xavier (2009) observou que este ocasionou 80% mortalidade dos adultos de *A. mellifera* após quatro

dias de exposição, aumentando a mortalidade de acordo com o tempo de exposição ao produto.

Alves (2010) conduziu experimento com a criação artificial de larvas de *A. mellifera* em laboratório alimentadas com diferentes porções de água, mel e pólen apícola; água, flores de neem e pólen apícola; água, flores de neem e mel; água e flores de neem; água, mel, pólen apícola e cheiro das flores de neem e água, flor de neem, mel e pólen apícola. Segundo o autor, as larvas que receberam flores de neem e mel apresentaram 100% de mortalidade nos quatro dias iniciais do experimento.

Vilani (2013) verificou que extrato de uva-do-japão reduziu a longevidade de *A. mellifera* em 54,20 h quando pulverizado (na concentração de 1mL do extrato vegetal à 5%), sobre adultos de *A. mellifera*.

Em estudos testando a seletividade de produtos fitossanitários naturais, Xavier (2009) verificou que Natualho[®] na dosagem recomendada (1mL/200mL de calda) apresentou toxicidade a adultos de *A. mellifera*, provocando mortalidade de 55% após quatro dias de exposição em folhas de abóbora imersas em solução aquosa contendo os inseticidas botânicos.

Efrom (2009) observou que Natuneem[®] (500 mL/100L) e Pironat[®] (250mL/100L), quando aplicados por via de contato (nas concentrações 0,25x, 0,5x, 1x e 2x a dose recomendada) sobre operárias de *A. mellifera* não interferiram na longevidade (48 h) das abelhas.

Simionatto (2013) ao realizar estudos pulverizando diretamente Natuneem[®] (0,5mL/1L) sobre operárias de *A. mellifera*, verificou que o produto após 82 h não interferiu na longevidade das abelhas.

Os avanços nas pesquisas envolvendo o controle biológico e o alternativo são fundamentais para auxiliar no controle dos insetos pragas, bem como, na preservação dos insetos benéficos e na proteção do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ABMEL- Associação Brasileira de Exportadores de Mel. Dados da produção de mel.

Disponível em:

http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_dezembro.pdf

ALMEIDA, J.C.; ALBUQUERQUE A.C.; LIMA, E. A. L. A. Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) artificialmente infectado. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.473-480, out./dez., 2005.

ALVES, Sergio B. **Controle microbiano de insetos**. 2ª ed. São Paulo: Editora Fealq, 1998.

ALVES, Sérgio B. MOINO JR, Alcides. ALMEIDA, José E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, Sérgio B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

ALVES, Sergio B.; ROSSI, Luciana S.; LOPES, Rogério B.; TAMAI, Marcos A; PEREIRA, Roberto M. *Beauveria bassiana* yeast phase on Agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.81, n.4, p.70-77, 2002.

ALVES, B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMIA, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. São Paulo: Editora FAELQ, 2008. p. 69-110.

ALVES, José E. **Toxicidade do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.: Meliaceae) para *Apis mellifera* e sua importância apícola na caatinga e mata litorânea cearense**. 2010. Tese de Doutorado. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Doutorado Integrado UFCUFPB- UFRPE. Universidade Federal do Ceará. 129p.

ALONSO, Junior 1998. **Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas**. ISIS Ediciones S. R. L., Buenos Aires, Argentina. págs. 350-354.

ÂNGELO, Elisangela A.; Vilas-Bôas, Gislayne. T.; CASTRO-GÓMEZ, Raúl J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez. 2010.

ARONSON, A.I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 1195, p. 1-8, 2001.

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

BARBOZA, Marcos, R.; SILVA, Dener N.; LUSTOSA, Sebatião B. C.; HIROSE, Edson. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência Guarapuava** (PR) v.7 n.3 p. 473-480 Set./Dez. 2011.

BRIGHENTI, Deodoro M.; CARVALHO, César F.; CARVALHO, Geraldo A.; BRIGHENTI, Carla Regina G.; CARVALHO, Stephan 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, 2007.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sargeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cit toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n.4, p. 423-435, jan. 2007.

BUTT T.M., JACKSON C. AND MAGAN N. Introduction – Fungal as Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Fungi as biocontrol agents, CABI Publishing, **Wallingford**, Oxford, pp 1-8, 2001.

CAMARGO, João Maria Franco de (Org). **Manual de apicultura**, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p.19, 1972.

CASTRO, Daniela P.; **Atividade inseticida de óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum***. Minas Gerais, 2004. 87p. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras.

CAVALCANTE, Giani M. MOREIRA, Albert F. C. VASCONCELOS, Simão D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.9-14, jan. 2006.

CINTRA, Pricila; MALASPINA, Osmar; PETACCI, Fernando; FERNANDES, João B.; BUENO, Odair C.; VIEIRA, Paulo C.; SILVA, Maria F.G.F. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to Workers of *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n. 1, p.115-118, jan. 2002.

COIMBRA, João L.; CAMPOS, Vicente P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinobactérias na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.232-238, 2005.

CORREIA JUNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Plantas medicinais**. 2 ed. Jaboticabal : FUNEP, 1994. 162p.

COSTA, Emerson L. N; LUCHO, Andresa P. R; FRITZ, Leila L; FIUZA, Lidia M. Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. N. 38, p.4-13, 2010.

COSTA-MAIA, Fabiana M.; LOURENÇO, Daniela A. L.; TOLEDO, Vagner A. A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. In: MARTIN, T.N.; WACLAWOVSKY, A.J.; KUSS, F.; MENDES, A.S.; BRUN, E.J. (Org.). **Sistemas de Produção Agropecuária** - (Ciências Agrárias, Animais e Florestais). Dois Vizinhos (PR): UTFPR, 2010, Cap.3, p. 45-67.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. **Rockville: American Society of Plant Physiologists**, 2000.

DALLACORT, Sidinei.; LUCKMANN, Daiane.; POTRICH, Michele.; SILVA, Everton. R. L. da; OLIVEIRA, Thiego. M.; MATOS, LIMA, Lisia. de. **Perfil dos agricultores agroecológicos do Sudoeste do Paraná**. Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Porto Alegre/RS. 2013.

DESTÉFANO, Ricardo H. R. **Deteção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea Saccharalis* por primers específicos**. 2003. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

DINIZ, Lylian P., MAFFIA, Luiz A.; DHINGRA, Onkar D.; CASALI, Vicente W.D., SANTOS, Ricardo H.S.; MIZUBUTI, Eduardo, S.G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.171-9, 2006.

EFROM, Caio F. S. **Criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em dietas artificiais e avaliação de produtos fitossanitários utilizados no sistema orgânico de produção sobre esta espécie e insetos benéficos**. Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Agosto, p.89, 2009.

EMBRAPA. Agrobiologia Sistemas de Produção, 2ª Edição ISSN 1806-2830 **Versão Eletrônica**. Dez./2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>

EMBRAPA. Manejo Integrado do Mandorová-da-Mandioca *Erinnyis ello* L. (Lepidoptera: Sphingidae): Conceitos e Experiências na Região do Vale do Rio Juruá, Acre. Embrapa. Acre/ Rio Branco, AC 2007. **Versão Eletrônica**. Disponível em: <http://iquiri.cpaufac.embrapa.br/pdf/doc107.pdf>

EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Versão Eletrônica**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/. S. a.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária: Fortaleza, 2004. p.19-20.

FAZOLIN, Murilo; ESTRELA, Joelma L. V.; LIMA, Aldair P. de; ARGOLO, Valdirene M. 2002. Evaluation of plants with insecticide to control the cow-the-bean. Rio Branco: EMBRAPA-CPAFAC, 42p (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 37).

FREITAS, Débora G. F.; KHAN, Ahmad S.; SILVA, Lúcia M. R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará Rev. **Econ. Sociol. Rural** vol.42 no.1 Brasília Jan./Mar. 2004.

GANDHI, Nirjara; PILLAI, Sujatha; PATEL, Prabhudas. Efficacy of pulverized *Punica granatum* (Lythraceae) and *Murraya koenigii* (Rutaceae) leaves against stored grain pest *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 12, p. 616–620, 2010.

GALLO, Domingos, O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 920p.

GONÇALVES, Lionel S. 50 anos de abelhas africanizadas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Aracajú. **Anais...CBA**, 2006.

HIRAKURI, Marcelo H.; OLIVEIRA, Arnold B. de; TAVARES, Luís C.V.; SEIXAS, Claudine D.S.; PASTOR, Alcino. Avaliação econômica do cultivo orgânico de soja no Estado do Paraná para a safra 2010/2011. Londrina: Embrapa Soja, 2011.9p (**Embrapa Soja. Circular Técnica**, 85).

JÚNIOR, Claudio, V. Terpenos Com Atividade Inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. Vol. 26, No. 3, p. 390-400, 2003.

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* γ -endotoxins with different insect specificity. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 924, p. 509-518, 1987.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal deltaendotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, v. 2, p. 257-262, 1994.

LEITE, Luis G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto: **Alexandre de Sene Pinto**, 2003. 92p.

LINCOLN, Taiz.; ZEIGER, Eduardo.; **Fisiologia Vegetal** - 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

LORENZI, Harri; MATOS, F.J.Abreu. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2 ed., p.350-351. São Paulo, 2008.

LUCKMANN, Daine. **Compatibilidade de produtos naturais comerciais a fungos entomopatogênicos e seletividade a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.

MALERBO-SOUZA, Darcelet T; NOGUEIRA-COUTO Regina H.; COUTO Lemom de A.; SOUZA, Júlio C. 2003. Atrativos para abelhas *Apis mellifera* e polinização em laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pêra-Rio). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, pp. 272-278.

MANN, C; STABA, E. J. The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Herbs, Spices and Medicinal Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology. L. E. Craker & J. E. Simon, Editors. **Oryx Press, Phoenix, AZ**, 1986. p. 235-280.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon. 1995. 374 p.

MANNS, D., HARTMANN, R. Echinodol: A new cembrene derivate from from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Med**, v.59, p.465-467, 1993.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/02/aumenta-numero-de-produtores-de-organicos-no-brasil> Acesso: fevereiro/2014.

MELO, Itamar S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v.1,264p.

MENEZES, Elaine L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiologia**, 2005. 58p.

NOGUEIRA NETO, Paulo. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J.M. F. (Ed). Manual de apicultura. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1972.

OLIVEIRA, Marco A. P.; MARQUES, Edmilson J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, Vanderleia; BARROS, Reginaldo. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

OLIVEIRA, Harley N.; ÁVILA, Crebio. J. Controle biológico de pragas no Centro-Oeste brasileiro. G.BIO: **Revista de Controle Biológico**, Piracicaba, p. 11-13, abr. 2010.

ONOFRE, Sidinei B. et al. **Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). Biotecnologia – avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 295-328.

ORLANDELLI, Ravelly C.; PAMPHILE, João A. Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. SaBios: **Revista Saúde e Biologia** 6(2):79-82, 2011.

PANDE G.; AKOH C.C. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgiagrown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.20, p.9427-9436, 2009.

PARRA, José R.P.; BOTELHO, Paulo S.M.; CORREA-FERREIRA, Beatriz; BENTO, José M. **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. 626p.

PEDIGO, L. P. Entomology and pest management. 3.ed. **Englewood: Prentice Hall**, 1999. 691p.

PEGORARO, Adhemar; ZILLER, Silvia R. Valor Apícola das Espécies Vegetais de duas Fases Sucessionais da Floresta Ombrófila Mista, em União da Vitória Paraná – Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.47, p.69-82, jul/dez. 2003.

PEREIRA, Jozinete V.; PEREIRA, Maria do S. V.; HIGINO, Jane S.; ALVES, Pollianna M.; ARAÚJO, Cristina R. F. Estudos com o extrato da *Punica granatum* L. (romã): Efeito Antimicrobiano In Vitro e Avaliação Clínica de um Dentífrico sobre microrganismos do Biofilme Dental. **Revista Odonto Ciência** – Faculdade Odontologia/PUCRS, v. 20, n. 49, jul./set. 2005.

PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal 1854), em pastagem de capim (*Brachiaria decumbens*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 465-469, 2008.

PEREIRA, Fábila M.; LOPES, Maria T.R. O início da Apicultura no Brasil. Página **Rural**, 6 an 2011. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/artigo/2189/o-inicio-da-apicultura-no-brasil>>.

PINTO, Ângelo C.; SILVA, Dulce H. S.; BOLZANI, Vanderlan da S.; LOPES, Norberto P.; EPIFANIO, Rosângela de A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

POLANCZYK, Ricardo; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideu, v.7, p.1-10, 2003.

POLANCZYK, Ricardo A., F.H. VALICENTE; M.R. BARRETO. 2008. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina, p.111-136. In Alves, S.B. & R.B. Lopes (eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, FEALQ, 414p.

RIBEIRO, Roberta O.R. **Elementos traço em méis de abelhas (*Apis mellifera*) do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Influencia da sazonalidade**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2010.

SANAGIOTTO, Fernando; LUCKMANN, Daiane; SILVA, Everton, R. L.; POTRICH, Michele; PADILHA, Matheus, L. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre ovos de percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). Resumos do **VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia**. vol 8, No. 2, 2013.

SAITO, Maria L., J. GUSMAN; R. SANTOS. 2004. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Rev. Ecotox. Meio Ambiente**, 14: p.1-10.

SANTOS, José dos; SANTOS, Ozildo dos; SANTOS, Rosélia M. de S.; FERNANDES, Almir de A.; SOUTO, José da S.; BORGES, Maria da G. B.; FERREIRA, Reginaldo T. F. V.; SALGADO, Alberto Bandeira. Os sistemas alternativos de produção de base agroecológica. **Revista AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO-ACSA**: V. 9, n. 1, p. 01-08, jan - mar, 2013.

SANTORO, Patricia H.; NEVES, Pedro M.O. J; ALEXANDRE, Talita M.; SARTORI, Daniele; ALVES, Luis F.A.; FUNGARO, Maria H.P. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, n.2, p.83-90, fev. 2008.

SEAB- Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Rural Paranaense.

Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/VBP12com.pdf>

SILVA, Aleksandro S.; QUINTAL, Aamanda P.N.; MONTEIRO, Sílvia G.; DOYLE, Rovaiana L.; SANTURIO, Janio M.; BITTENCOURT, Vânia R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1944-1947, nov-dez. 2006.

SILVA, W. O. B. da.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus infection. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, p. 10-15, 2010.

SILVA, Everton R.L.; NEVES, Pedro; ALVES, Luis F.; POTRICH, Michele; Jéssica C ROMAM; CECHIM, Flavio; PIETROWSKI, Vanda. Seletividade de produtos alternativos a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) **XXII SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico – São Paulo/2011.**

SILVA, Roberto C.P.A.; PEIXE, Blênio C.S. Estudo da Cadeia Produtiva do Mel no Contexto da Apicultura Paranaense – uma Contribuição para a Identificação de Políticas Públicas Prioritárias. **Secretaria de Estado a Agricultura e do Abastecimento.** Curitiba: SEAB, 2012.

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

SMANIOTTO, Lisoneia F. **Seletividade de inseticidas alternativos a *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

SOUZA, Darcet C. **Apicultura:** manual do agente de desenvolvimento rural. Brasília: SEBRAE, 100 p., 2004.

SOUZA, E. A, KADRI, S. M., ORSI, R. O. Importância da polinização por abelhas *Apis mellifera* na agricultura. **VI Simpósio de Ciências e VII Encontro de Zootecnia – UNESP- Dramacena**, 2010.

SOSA-GÓMEZ Daniel R, Pereira R M, Alves, Sergio B. 1998 Impacto ambiental de entomopatógenos, p. 1075-1095. In Alves S B (ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

TONUS, Mirna. Manejo integrado controla cigarrinhas em pastagens. **Revista Balde Branco**, São Paulo, n. 421, 1999.

VARGAS, T. **Avaliação da Qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais da Paraná. 2006**. 148f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

VENDRAMIM, José D; CASTIGLIONE, Enrique. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C; DRESTER da COSTA, I., CASTIGLIONE, E. **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. Cap. 8, p. 113-128.

VENZON, Madelaine; JÚNIOR, Trazilbo, J. P.; PALLINI, Angelo. Controle alternativo de pragas e doenças: Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. Viçosa, **Epamig**, 2010.

VILANI, Andreia. **Atividade de Produtos Fitossanitários Naturais sobre *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* e Seletividade *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2013. 87 f. Dissertação Mestrado. Pato Branco: UTFPR. 2013. 83p.

WIESBROOK, M.L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, Urbana, v.17, n.3, p.1-3, 2004.

YAMAMOTO, P.T.; PINTO, R.A.; PAIVA, P.E.B. & GRAVENA, S. Seletividade de acaricidas a inimigos naturais em citros. In: OLIVEIRA, C.A.L. & DONADIO, L.C. (Eds.). **Leptose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.159-170.

XAVIER, Vânia M. **Impacto de Inseticidas Botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae)**. Dissertação de Mestrado. Viçosa: UFV. 2009. 43p. 2

3 CAPÍTULO I - EFEITO DE ENTOMOPATÓGENOS SOBRE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE).

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Efeito de entomopatógenos sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

3.1 RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de entomopatógenos sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Para isto, a exposição das abelhas aos entomopatógenos (produtos) foi realizada usando-se técnicas de pulverização direta, dieta contaminada e contato em superfícies tratadas (folhas de soja e caixas gerbox). Estabeleceram-se cinco tratamentos: água destilada esterilizada (testemunha), água destilada esterilizada com Tween[®] 80 (0,01%), e os produtos biológicos comerciais Metarril[®] WP (na concentração 1×10^9 conídios. mL⁻¹), Boveril[®] WP (na concentração 1×10^8 conídios. mL⁻¹) e Thuricide[®] WP (na concentração 1×10^8 conídios. mL⁻¹). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com 20 abelhas operárias (*A. mellifera*) por repetição, estas foram acondicionadas em caixa gerbox e posteriormente em câmara climatizada tipo B.O.D. (27 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, fotofase de 12 h). A mortalidade/sobrevivência das operárias foi avaliada a partir de uma hora até às 240 horas, sendo os dados submetidos ao procedimento Bayesiano. As operárias mortas pela ingestão de pasta Cândi, contaminada com os produtos, foram separadas e selecionadas aleatoriamente para a retirada do intestino (mesêntero) e posterior análise histológica. O mesêntero, depois de retirado, foi fixado em Bouin e preparado para histologia, conforme procedimentos padrões. Os mesmos foram avaliados quanti e qualitativamente. Verificou-se que o produto Boveril[®] reduziu a sobrevivência das abelhas em todos os bioensaios, Thuricide[®] reduziu em 53% (131,3 horas) a sobrevivência das abelhas no bioensaio com pasta Cândi incrementada com esse entomopatógeno, porém Metarril[®] não interferiu na sobrevivência de operárias *A. mellifera* nos bioensaios realizados. Os tratamentos com os produtos biológicos comerciais não provocaram alterações morfométricas no mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com os mesmos. O produto Boveril[®] apresentou efeito negativo sobre a sobrevivência/longevidade das operárias de *A. mellifera*, reduzindo a mesma.

Palavras-chave: Entomopatógenos. Sobrevivência. Estatística Bayesiana.

3.2 ABSTRACT

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Effect of entomopathogens on *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

This study evaluated the effect of entomopathogens on *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). The exposure of bees to the entomopathogens (product) was performed using techniques of direct spray, contaminated food and contact with treated surfaces (soybean leaves and gerboxes). Five treatments have been settled: sterile distilled water (control), sterile distilled water with Tween[®] 80 (0,01%), and the biological commercial products Metarril[®] WP (concentration 1×10^9 conidia. mL⁻¹), Boveril[®] WP (concentration 1×10^8 conidia. mL⁻¹) and Thuricide[®] WP (concentration 1×10^8 conidia. mL⁻¹). Each treatment was consisted of five replicates, with 20 worker bees (*A. mellifera*) per replication, and these were placed in Gerboxes and later in a climate chamber type B.O.D (27 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, photoperiod of 12 h). The mortality/ survival of the workers were assessed from one hour to 240 hours, and the data submitted to the Bayesian procedure. The workers killed by the ingestion of contaminated Candi paste, contaminated with the products, were separated and randomly selected for the withdrawal of the intestine (midgut) and subsequent histological analysis. The midgut after removed was fixed in Bouin and prepared for histology as standard procedures. The same quantity and quality have been assessed. It has been found that the product Boveril[®] reduced the bees' survival in all bioassays. Thuricide[®] reduced by 53% (after 131.3 hours) the bees' survival in this bioassay with Candi paste increased with this entomopathogen, but Metarril[®] did not affect the survival of workers *A. mellifera* in the bioassays accomplished. The treatments with the biological commercial products haven't caused morphological changes in the midgut of *A. mellifera* fed with Candi paste incorporated to these products. The product Boveril[®] showed a negative effect on the survival / longevity of workers of *A. mellifera*, reducing the same.

Keywords: Entomopathogens. Survival. Bayesian Statistics.

3.3 INTRODUÇÃO

O uso de inseticidas sintéticos é um dos recursos mais utilizados pelos agricultores para elevar a produtividade e controlar insetos-praga nos sistemas de produção agrícola (VEIGA et al., 2006).

No entanto, o controle biológico de insetos-praga vem ganhando espaço e atenção tem como finalidade utilizar inimigos naturais para controlar o número de animais. Estes inimigos naturais podem ser os vírus, nematoides, fungos e bactérias (SHAH; WANG; BUTT, 2005), que quando causam doenças em insetos são chamados entomopatógenos.

Os fungos entomopatogênicos são os principais responsáveis pela mortalidade natural de insetos-praga em agroecossistemas, destacando-se os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). A infecção ocorre devido à penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros entomopatógenos, que só penetram no inseto via oral (ALVES, 1998; ALVES; PERREIRA, 1998). No entanto, estes fungos, de origem natural ou aplicados no ambiente, podem comprometer o desempenho de insetos úteis, que entrando em contato com estes, podem ser contaminados.

As bactérias entomopatogênicas destacam-se como promissoras no controle microbiano, entre essas, *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), sendo utilizada em formulações de produtos biológicos comerciais. A comercialização do primeiro produto à base desse entomopatógeno foi iniciada em 1938 na França, com o nome de “Sporeine” (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004).

Apresentando propriedade entomopatogênica, *B. thuringiensis* pode ser encontrada em praticamente todos os ambientes (PRAÇA et al., 2004), sendo utilizado como bioinseticida no controle de insetos praga de diferentes cultivos agrícolas (POLANCZYK, 2004), como tomate, algodão, citros, mandioca, soja, trigo e milho (BRAVO et al., 2011).

Apesar dos entomopatógenos serem considerados seguros, podem causar efeitos negativos sobre os organismos não alvos. Assim, trabalhos vêm sendo desenvolvidos para avaliar o efeito destes entomopatógenos sobre organismos não alvos. Brighenti et al. (2007) verificaram, que o produto Dipel®/100mL de água, quando pulverizado (2,5g) sobre operárias de *A. mellifera*, interferiu na longevidade, reduzindo a menos de 60 horas.

Em experimento de seletividade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Potrich et al. (2009) verificaram que *B. bassiana* não provocou mortalidade nas fêmeas de *Trichogramma pretiosum* (Riley) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que realizaram o parasitismo em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) pulverizados com este fungo, não interferindo no parasitismo ou na emergência da progênie. Entretanto o fungo *M. anisopliae*, interferiu negativamente nestes parâmetros e provocou mortalidade confirmada em *T. pretiosum* de 16,7%, diferindo significadamente da testemunha.

Entre os organismos não alvos, destaca-se a abelha *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), considerada um inseto útil ao homem, pelos produtos gerados e por ser um agente polinizador. O papel dos agentes polinizadores é tão importante nos ambientes naturais, que em um estudo realizado com 186 espécies de plantas com flores, 46% mostraram-se limitadas reprodutivamente, quando da ausência dos polinizadores (MALASPINA et al, 2008), sendo as abelhas o principal grupo animal de polinizadores (BIESMEIJER; SLAA, 2006, RICKET et al. 2008).

Além do importante papel na polinização, as abelhas *A. mellifera* produzem mel, própolis, cera, pólen, geleia real e apitoxinas, sendo que a comercialização desses produtos auxilia na renda de muitos produtores agrícolas, além dos apicultores (WOLFF; REIS; SANTOS, 2008).

A apicultura ocupa lugar de destaque na economia nacional, com cerca de 350 mil apicultores, sendo a maioria agricultores familiares, o que elevou o Brasil ao 11º lugar no ranking mundial de produtor de mel e o quinto maior exportador desse produto (SEBRAE, 2014). Um dos fatores desse sucesso é o correto manejo das colônias e a especialização, mesmo que ainda incipiente, da mão de obra empregada.

Apesar dos cuidados empregados no apiário, no momento do forrageamento, as abelhas operárias podem entrar em contato com produtos que estejam nas flores e que sejam tóxicos a elas ou à colméia. Devido à necessidade de conservação desse inseto, a sua importância para o ambiente e ao baixo número de informações a respeito da interferência dos produtos, em especial dos entomopatogênicos sobre *A. mellifera*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos entomopatogênicos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* e *B. thuringiensis*) sobre *A. mellifera*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) Apicultura e no Laboratório de Controle Biológico, ambos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Foram realizados quatro bioensaios (diferentes formas de aplicação dos produtos), para avaliar o efeito dos entomopatógenos, *M. anisopliae* (Metarril[®] WP Organic), *B. bassiana* (Boveril[®] WP) e *B. thuringiensis* (Thuricide[®] WP) sobre *A. mellifera*.

3.4.1 Obtenção dos entomopatógenos:

Os entomopatógenos utilizados foram *M. anisopliae* obtido do produto comercial Metarril[®] WP (na concentração 1×10^9 conídios. mL⁻¹), *B. bassiana* obtido do produto comercial Boveril[®] WP (na concentração 1×10^8 conídios.mL⁻¹), e a bactéria *B. thuringiensis* obtido do produto comercial Thuricide[®] WP (na concentração 1×10^8).

3.4.2 Obtenção de *A. mellifera*

As operárias de *A. mellifera* africanizadas foram obtidas por meio de favos tipo Langstroth de cria operculada provenientes do Apiário Experimental da UNEPE Apicultura da UTFPR-DV. A seleção dos mesmos foi baseada na qualidade e quantidade de oviposição da rainha. Posteriormente estes quadros foram acondicionados em sacos de papel Kraft (60 centímetros (cm) x 70 cm com gramatura 50), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico, sendo mantido em câmara climatizada tipo Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.) ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 10\%$) para emergência uniforme das operárias, simulando o ambiente da colônia de origem. Após 24 horas realizou-se a coleta das abelhas (zero dia de idade) através do método de sucção, com o auxílio do tubo telado.

Para alimentação das abelhas preparou-se pasta Cândi pura, misturando-se 50 gramas (g) de açúcar de confeitiro com 10 mililitro (mL) de mel puro, até formar uma massa homogênea.

3.4.3 Bioensaio 1- Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre *A. mellifera*

Os tratamentos utilizados nos bioensaios 1, 2 e 3 foram compostos por: Água destilada esterilizada, Água destilada esterilizada + Tween[®] 80 (0,01%), Metarril[®] WP (na concentração 1×10^9 conídios. mL⁻¹), Boveril[®] WP (na concentração 1×10^8 conídios. mL⁻¹) e Thuricide[®] (na concentração 1×10^8 conídios. mL⁻¹)

As operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com dióxido de carbono (CO₂) (120 segundos), foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, em grupos de 10 indivíduos. Cada grupo foi pulverizado com 1 mL do tratamento, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante (1,2 kgf/cm²). O mesmo procedimento foi realizado para todos os tratamentos/repetições.

Cada grupo de 10 abelhas foi transferido para o interior das caixas gerbox. Essas caixas gerbox foram vedadas com tecido tipo *voil* e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada, sendo umedecido periodicamente para evitar ressecamento, como alimento foi fornecido pasta Cândi pura. As caixas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 10\%$). Cada duas caixas gerbox foi considerada uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição (cada abelha foi considerada uma unidade experimental).

A mortalidade das operárias foi avaliada a partir da uma até às 240 horas após o início da exposição das abelhas aos tratamentos, para estimar o período de sobrevivência de *A. mellifera*, realizando a contagem dos insetos mortos (metodologia adaptado de BAPTISTA et al., 2009).

As operárias mortas, verificadas nos tratamentos com a utilização dos entomopatógenos, serão colocadas em câmara úmida, para confirmação da mortalidade pelo fungo (ALVES, 1998).

3.4.4 Bioensaio 2- Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em superfície vítrea.

Pulverizou-se 1 mL do tratamento sobre uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizada, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante (1,2 kgf/cm²). Posteriormente, dispôs-se essa placa em câmara de fluxo laminar horizontal para a evaporação completa do tratamento. Este procedimento foi repetido para cada tratamento/repetição.

As operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO₂ por 120 segundos foram colocadas no interior de cada placa de Petri (permanecendo nesta placa durante todo o experimento). Cada duas caixas gerbox foram consideradas uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição (cada abelha foi considerada uma unidade experimental).

As caixas gerbox foram vedadas com tecido tipo *voil*, sobre este tecido foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada, sendo umedecido periodicamente para evitar ressecamento, como alimento foi fornecido pasta Cândi pura. Os demais procedimentos, como acondicionamento e avaliação, foram realizados conforme descritos no bioensaio 1.

3.4.5 Bioensaio 3- Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

Folhas de soja, sem tratamento fitossanitário, foram coletadas e imersas por cinco segundos no tratamento, em seguida, foram colocadas em câmara de fluxo laminar horizontal para evaporação completa do tratamento. Este procedimento foi repetido para cada tratamento/repetição. Posteriormente, estas folhas foram dispostas, em caixas gerbox, operárias de *A. mellifera* foram anestesiadas com CO₂ por 120 segundos e colocadas no interior dessas caixas.

Cada duas caixas gerbox foram consideradas uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição (cada abelha foi considerada uma unidade experimental).

Estas caixas foram vedadas com tecido tipo *voil* e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada, sendo umedecido periodicamente para evitar ressecamento, como alimento foi fornecido pasta Cândi pura.

Os demais procedimentos, como acondicionamento e avaliação, foram realizados conforme descritos no bioensaio 1.

3.4.6 Bioensaio 4- Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Cândi sobre, *A. mellifera*

Os tratamentos deste bioensaio foram compostos por: Pasta Cândi pura, Pasta Cândi com Tween[®] 80 (0,01%), Pasta Cândi com Metarril[®] WP (na concentração 1×10^9 conídios. mL⁻¹) Pasta Cândi com Boveril[®] WP (na concentração 1×10^8 conídios. mL⁻¹) e Pasta Cândi com Thuricide[®] WP (na concentração conídios. mL⁻¹).

As operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO₂ por 120 segundos, foram transferidas para caixas gerbox. Cada duas caixas gerbox foram consideradas uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição (cada abelha foi considerada uma unidade experimental). Estas caixas foram vedadas com tecido tipo *voil* e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada, sendo umedecido periodicamente para evitar ressecamento. Como alimento foi oferecido pasta Cândi incorporada com um os entomopatógenos (produtos biológicos comerciais).

Para o preparo da pasta Cândi neste bioensaio, foi realizada uma mistura de 50 g de açúcar de confeito, 10 mL de mel puro e 0,03g dos tratamentos em pó, até formar uma massa homogênea. Foram preparadas duas testemunhas, sendo a primeira composta por pasta Cândi pura (sem adição dos tratamentos) e a segunda composta de pasta Cândi acrescida de Tween[®] 80 (0,01%).

Os demais procedimentos, como acondicionamento e avaliação, foram realizados conforme descritos no bioensaio 1.

3.4.6.1 Análise histológica do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com os entomopatógenos

Para a realização das análises histológicas, foram removidos cinco mesêntero por repetição/tratamentos (ventrículo), das operárias alimentadas com pasta Cândi incorporada com os extratos vegetais e as respectivas testemunhas da etapa 3.4.6, totalizando 75 mesênteros removidos, Figura 1.

Posteriormente, 400 amostras foram fixadas em Fixador *Bouin* (250 mL de formaldeído 40% + 50 mL ácido acético glacial PA + 750 mL de solução saturada de ácido pícrico 1,4%) por 4 h, lavadas em álcool 70% (3 x 15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento.

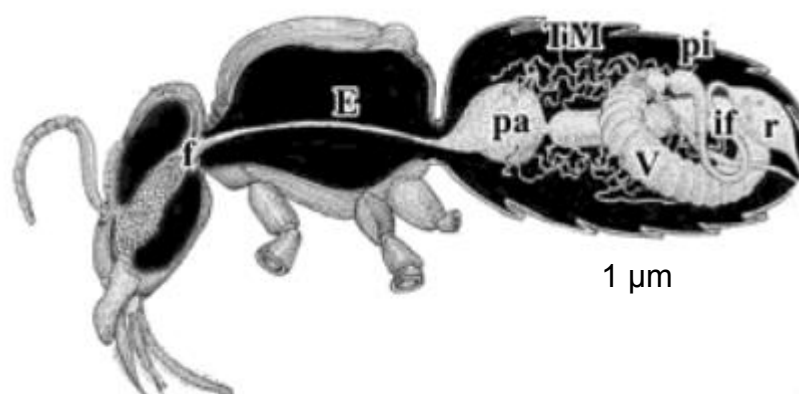


Figura 1: Representação esquemática de uma secção longitudinal de uma operária de *Scaptotrigona postica* mostrando o sistema digestório. f=faringe; E=esôfago; pa=papilo; V=ventrículo; pi=piloro; if=intestino fino; r=reto; TM=túbulo de Malpighi

Fonte: CRUZ-LANDIM (2009, p. 266).

As amostras foram desidratadas por imersão em álcool em diferentes concentrações (álcool 80%: 10 minutos, álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100% I: 30 minutos, álcool 100% II: 30 minutos), sendo posteriormente diafanizadas por imersão em Xilol (Álcool/Xilol 1:1: 15 minutos; Xilol I: 30 minutos e Xilol II: 30 minutos). Na sequência realizou-se a

parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1: 60 minutos; Parafina Histológica I: 12 horas e Parafina Histológica II: 2 horas) e o emblocamento em Parafina Histológica (Parafina Histológica/Cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo Rotativo Manual, em cortes de 2 a 7 micrometros (μm) de espessura, montados em lâmina de vidro de ponta fosca para microscopia (3,0 × 10,0 cm) contendo solução de albumina, sendo então assentados sobre chapa quente para distensão dos cortes. Na sequência, foram eliminados os resíduos de albumina e as lâminas permaneceram sete dias em estufa a 35 °C, para secarem completamente.

Os cortes foram corados pelo método Hematoxilina/Eosina (H/E), para isto foi realizado a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 2 minutos, álcool 100% II: 2 minutos) e a posterior reidratação destes (álcool 90%: 1 minuto, álcool 80%: 1 minuto, lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em Hematoxilina (4 minutos), lavados em água corrente (10 minutos), banhados em Eosina (2 minutos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em temperatura ambiente por três dias, para a secagem dos corantes, sendo, posteriormente, recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cm × 3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio de Luz Opton trinocular TNB-40T-PL, com câmera digital para captura de imagens, com auxílio do programa software ScopePhoto 2.04. Foi realizada avaliação quantitativa, mensurando-se a altura das células do mesêntero das abelhas e avaliação qualitativa, mensurando-se alterações teciduais, comparando os tecidos das operárias de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com os entopatógenos com os tecidos das operárias alimentadas com pasta Cândi pura (soluções testemunhas).

3.4.7 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado nos quatro bioensaios para análise de sobrevivência foi o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições cada, com 20 abelhas operárias, sendo cada abelha considerada uma

unidade experimental. Foram utilizados os seguintes procedimentos: Frequentista não-paramétrico, frequentista paramétrico e Bayesiano através do pacote Survival do software R[®] (2013).

O comportamento da variável aleatória contínua, tempo de sobrevivência, $T \geq 0$, pode ser expresso através de várias funções matematicamente equivalentes, tais que, se uma delas é especificada, as outras podem ser derivadas. Entre elas tem-se: a

função densidade probabilidade, $f(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T \leq t + \Delta t)}{\Delta t}$, definida como o limite da probabilidade de um indivíduo experimentar o evento de interesse no intervalo de tempo $[t, t + \Delta t]$ por unidade de tempo tal que $f(t) \geq 0$ para todo $t \geq 0$ e área abaixo da curva igual a 1; a função de sobrevivência, $S(t) = P(T \geq t) = 1 - F(t)$, sendo $F(t)$ a função de distribuição

acumulada e, a função de risco, $h(t) = \frac{f(t)}{S(t)}$, utilizadas na prática para descrever os diferentes aspectos apresentados pelo conjunto de dados (LOUZADA-NETO; MAZUCHELI; ACHCAR, 2002).

Procedimento frequentista não-paramétrico

Estimativas empíricas da função de sobrevivência foram obtidas pelo método de KAPLAN e MEIER (KM), por meio do comando survfit da livreria survival do programa computacional R. Este estimador é também conhecido na literatura como estimador produto-limite e permite a presença de observações censuradas.

Sua expressão é dada por $S_{KM}(t) = \prod_{r, t_r < t} \frac{n_i - d_i}{n_i}$, onde t_r é o maior tempo de sobrevivência menor ou igual a t , n_i é o número de indivíduos vivos até o tempo t_i e d_i representa o número de mortes no tempo t_i , onde i pode ser qualquer valor inteiro entre 1 e r . Na ausência de censuras, $S_{KM}(t)$ se reduz a $S_{KM}(t) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de animais com tempos de sobrevida } \geq t}{\text{N}^\circ \text{ total de animais}}$.

Procedimento frequentista paramétrico

Estimativas dos parâmetros das funções densidade probabilidade consideradas para o erro aleatório, ε_{ij} , associado a cada observação, a saber: Exponencial, Weibull e Log-Normal foram obtidas por meio do comando survreg da livreria survival do R. As funções densidade de probabilidade, $f(t)$, a função de sobrevivência, $S(t)$ e o percentil $t_p = 100p\%$ da distribuição, são descritas a seguir:

Modelo Exponencial

$$f(t) = \frac{1}{\alpha} \exp\left\{-\frac{t}{\alpha}\right\}, \quad S(t) = \exp\left\{-\frac{t}{\alpha}\right\} \quad e \quad t_p = -\alpha \log(1-p).$$

Observação: Sua notação é $T \sim \text{Exp}(\alpha)$ e $\alpha > 0$ é o parâmetro de escala que representa a média da distribuição da variável aleatória T.

Modelo Weibull

$$f(t) = \frac{\gamma}{\alpha^\gamma} t^{\gamma-1} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\}, \quad S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\} \quad e \quad t_p = \alpha \left[-\log(1-p)\right]^{\frac{1}{\gamma}}.$$

Observação: Sua notação é $T \sim W(\alpha, \gamma)$ e $\alpha > 0$ e $\gamma > 0$ são os parâmetros de escala e forma, respectivamente. Caso $\gamma = 1$ se obtém a distribuição Exponencial como caso particular.

Modelo Log-Normal

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma t} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\log t - \mu}{\sigma}\right)^2\right\}, \quad S(t) = 1 - \Phi\left(\frac{\log t - \mu}{\sigma}\right) \quad e \quad t_p = e^{(\mu + \sigma Z_p)}$$

Onde: Z_p é o p-ésimo percentil da distribuição Normal padrão.

Observação: Sua notação é $T \sim \text{LN}(\mu, \sigma)$ e $-\infty < \mu < +\infty$ e $\sigma > 0$ são os parâmetros de escala e forma, respectivamente. Para discriminação entre modelos analisados, o valor de -LogL (- log da verossimilhança) foi utilizado. Tal critério indica que melhores ajustes ocorrem quanto mais baixos seus valores forem. Para o melhor modelo ajustado, serão avaliadas as funções de sobrevivência e o percentil 50% (mediana) da distribuição, denominado tempo letal.

A verificação da significância do efeito de tratamento foi realizada por meio do teste Qui-quadrado e do modelo de Cox descrito por Colosimo & Giolo (2006) em nível

de 5% de significância, respectivamente, via comando `survreg` e `coxph`, ambos da livreria `survival` do R.

Procedimento Bayesiano

Modelo Weibull: Foi considerado que o tempo de vida (dias) segue distribuição Weibull, isto é, $T \sim W(\alpha, \lambda)$, com $\alpha > 0$ e $\lambda > 0$, respectivamente, parâmetros de forma e escala, assumindo convenientemente a reparametrização sugerida Ibrahim, Chen e

Sinha (2001) tal que, $\lambda = \log\left(\frac{1}{\alpha^\gamma}\right)$, fazendo $\beta = e^\gamma = \frac{1}{\alpha^\gamma}$ e consequentemente $\alpha = e^{\left(\frac{\log(\beta)}{\gamma}\right)}$.

Foram consideradas a priori, distribuições não-informativas para todos os parâmetros do modelo, isto é, $\lambda \sim N(0, 10^{-6})$ e $\gamma \sim Gama(10^{-3}, 10^{-3})$ (parametrização OpenBugs).

A obtenção das distribuições marginais a posteriori para os parâmetros foi por meio do pacote `BRugs` do programa computacional R. Como chutes iniciais para γ e λ foram considerados, respectivamente, o valor “1” e a estimativa frequentista. Foram gerados 1.100.000 valores em um processo MCMC, considerando um período de descarte amostral de 100.000 valores iniciais. A amostra final de tamanho 11.000 foi formada após saltos de tamanho 100 de modo a eliminar a autocorrelação entre valores gerados no processo.

A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote `coda` do R, usando os critérios de Geweke (1992) e de Heidelberger & Welch (1983). Os parâmetros dos modelos, assim como os efeitos dos contrastes entre tratamentos foram considerados significativos, se seus respectivos intervalos com 95% de credibilidade para as médias a posteriori, não incluíram o valor zero (ROSSI, 2011).

Para realização das análises Histológicas, os dados dos testes quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott Knott, com 5% de significância no programa `Assistat` (SILVA, 2012).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre *A. mellifera*

Os entomopatógenos estudados interferiram negativamente na sobrevivência das abelhas *A. mellifera* (Tabela 1).

Os entomopatógenos *B. bassiana* (Boveril[®] WP) e *M. anisopliae* (Metarril[®] WP), quando pulverizados sobre as operárias de *A. mellifera*, reduziram a sobrevivência das mesmas, o que pode ser observado, após comparação com a sobrevivência das abelhas testemunhas (Figura 2 A).

3.5.2 Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em superfície vítrea

Os entomopatógenos *M. anisopliae* (Metarril[®] WP), *B. thuringiensis* (Thuricide[®] WP organic) e *B. bassiana* (Boveril[®] WP) reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera* (Tabela 1). Sendo que *B. bassiana* foi o entomopatógeno que mais interferiu na sobrevivência das operárias, ocasionando 92% de mortalidade após 97,3 horas em contato com as placas de Petri pulverizadas com o produto (Figura 2B).

3.5.3 Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

O entomopatógeno *B. bassiana* (Boveril[®] WP) interferiu negativamente na sobrevivência das operárias de *A. mellifera* (Tabela 1). *B. bassiana* ocasionou redução na sobrevivência de 81% das abelhas, que morreram após 89,17 horas em contato com o entomopatógeno (Figura 2 C).

3.5.4 Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Cândi, sobre *A. mellifera*

Os três entomopatógenos interferiram na sobrevivência das operárias (Tabela 1), sendo *B. bassiana* (Boveril[®] WP) e *B. thuringiensis* (Thuricide[®] WP organic) os

entomopatógenos que mais reduziram a sobrevivência de *A. mellifera*, ocasionando 57% e 53% mortalidade após 117,3 e 131,3 horas respectivamente (Figura 2 D).

Tabela 1- Tempo letal (50%) de sobrevivência (Mediana) (Média \pm DP) de operárias de *Apis mellifera* (Estimativas Bayesianas do parâmetro de forma do modelo Weibull). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2014.

Efeito entomopatógenos pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	64%	127,6 \pm 8,17 b
<i>M. anisopliae</i> (Metarril [®] WP)	80%	104,7 \pm 5,97 d
<i>B. bassiana</i> (Boveril [®] WP)	72%	62,6 \pm 3,01 e
<i>B. thuringiensis</i> (Thuricide [®] WP organic)	47%	167,2 \pm 7,60 a
<i>p</i>		<0,05
Efeito de entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i>, por contato em superfície vítrea		
	% mortalidade	Sobrevivência(horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	56%	197,8 \pm 4,80 a
<i>M. anisopliae</i> (Metarril [®] WP)	71%	128,0 \pm 5,80 c
<i>B. bassiana</i> (Boveril [®] WP)	92%	97,3 \pm 1,10 d
<i>B. thuringiensis</i> (Turicide [®] WP organic)	55%	144,9 \pm 8,00 b
<i>p</i>		< 0,05
Efeito de entomopatógenos sobre <i>A. mellifera</i>, por contato em folhas de soja		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	49%	133,9 \pm 6,91 c
<i>M. anisopliae</i> (Metarril [®] WP)	60%	134,4 \pm 6,90 b
<i>B. bassiana</i> (Boveril [®] WP)	81%	89,1 \pm 3,18 e
<i>B. thuringiensis</i> (Turicide [®] WP organic)	53%	136,1 \pm 8,03 a
<i>p</i>		< 0,05
Efeito de entomopatógenos misturados a pasta Cândi, sobre <i>A. mellifera</i>		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	49%	169,8 \pm 7,56 a
<i>M. anisopliae</i> (Metarril [®] WP)	43%	141,9 \pm 9,86 b
<i>B. bassiana</i> (Boveril [®] WP)	57%	117,3 \pm 7,88 d
<i>B. thuringiensis</i> (Turicide [®] WP organic)	53%	131,3 \pm 7,97 c
<i>p</i>		< 0,05

a,b,c,d,e Letras distintas na coluna, indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do contrastes Bayesianos em nível de 95% de credibilidade.

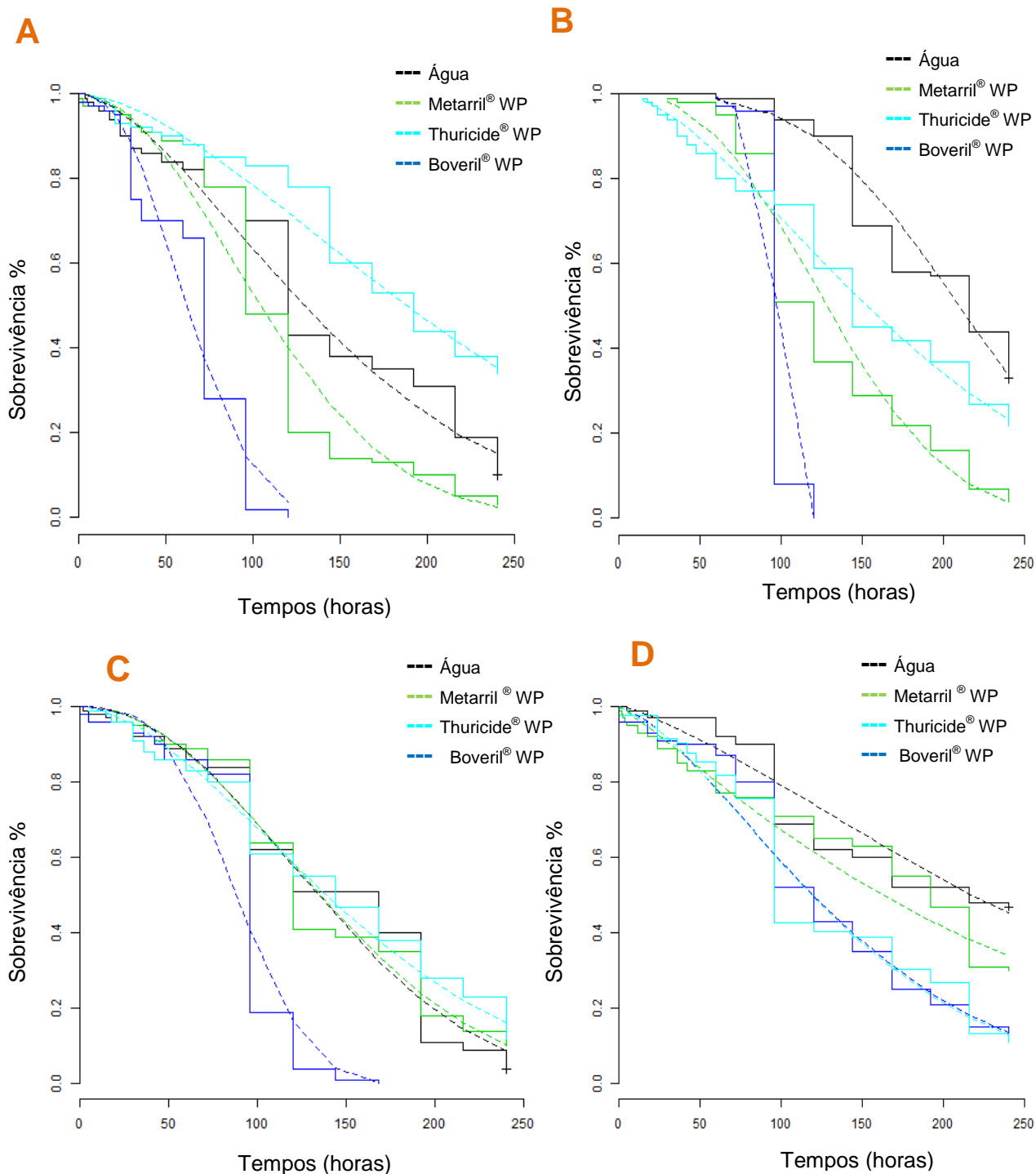


Figura 2: Curva de sobrevivência (horas) de *A. mellifera*. A) Pulverização com os entomopatógenos, B) Contato em superfície contaminada com os entomopatógenos, C) Contato com folhas de soja contaminadas com os entomopatógenos e D) Ingestão de pasta cândi misturada com os entomopatógenos, teste de sobrevivência Kaplan-Meier vs Weibull ajustadas aos tempos (horas). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$.

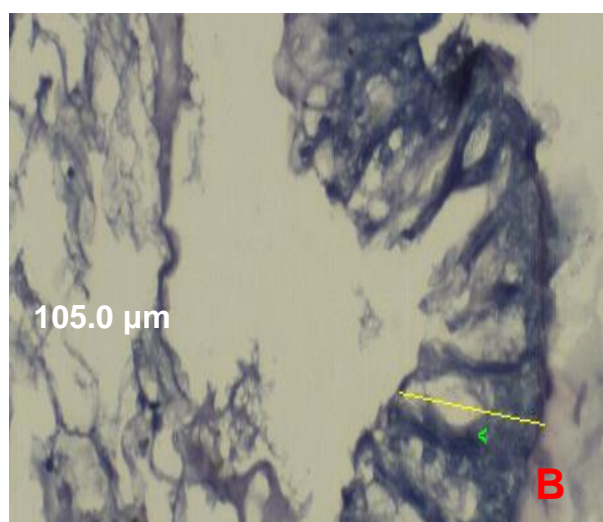
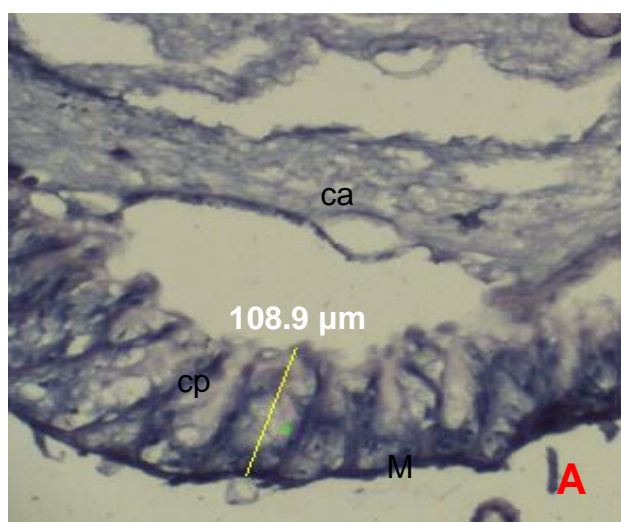
3. 5. 5 Análise histológicas do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com entomopatógenos

Não houve alterações no comprimento das células do mesêntero das operárias de *A. mellifera*, alimentadas com pasta cândi incorporada com *B. thuringiensis* (Thuricide®) (Figura 3 B), *B. bassiana* (Boveril®) (Figura 3 C) e *M. anisopliae* (Metarril®) (Figura 3D), não distinguindo do comprimento das células do mesêntero das operárias alimentadas com pasta Cândi pura (Figura 3 A) (Tabela 2).

Tabela 2- Comprimento (μm) (\pm EP) das células do mesêntero (ventrículo) de operárias de *Apis mellifera* após alimentação com pasta Cândi misturada com os entomopatógenos. Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014.

Tratamento	Células do mesêntero (μm)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	$106.7 \pm 8,33$ a
<i>M. anisopliae</i> (Metarril® WP)	$92.0 \pm 0,17$ a
<i>B. bassiana</i> (Boveril® WP)	$83.2 \pm 16,10$ a
<i>B.thuringiensis</i> (Thuricide® WP organic)	$102.3 \pm 18,42$ a
CV%	11,86

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



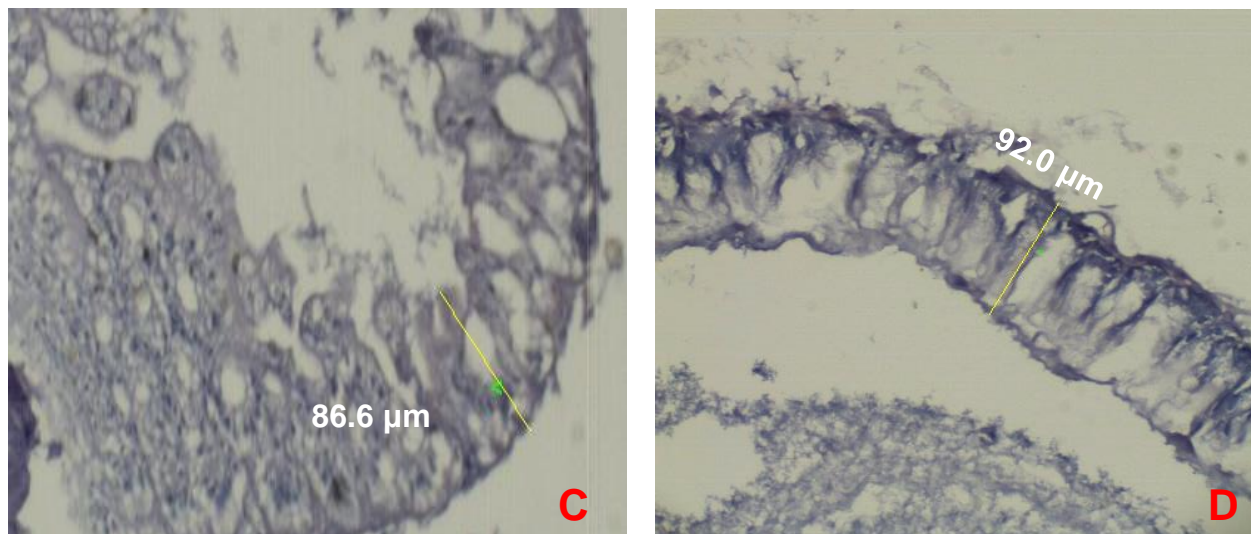


Figura 3. Fotomicrografia (microscópio de luz Opton trinocular tnb-40t-pl, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 10x) do mesêntero (ventrículo) de *A. mellifera* alimentadas com: A) Pasta cãndi pura; B) Pasta cãndi e Thuricide[®], C) Pasta cãndi e Boveril[®] e D) Pasta cãndi e Metarril[®]. ca: cobertura amorfa; cp: células principais; cr: ninhos de células regenerativas; M: musculatura circular.

3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Efeito dos entomopatógenos pulverizados sobre *A. mellifera*

Os entomopatógenos *B. bassiana* (Boveril[®] WP) e *M. anisopliae* (Metarril[®] WP), interferiram na sobrevivência das operárias de *A. mellifera* (Figura 2 A).

O entomopatógeno *B. bassiana* reduziu a sobrevivência de *A. mellifera*, provocando 72% de mortalidade, após 62,60 horas da pulverização (Tabela 1). Já o entomopatógeno *M. anisopliae* (Metarril[®] WP) ocasionou 80% de mortalidade após a pulverização do produto (104, 7 h) sobre as operárias de *A. mellifera* (Tabela 1).

Embora sejam relatados poucos estudos sobre o efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, alguns trabalhos foram realizados verificando a ação desses organismos sobre outros insetos da ordem Hymenoptera.

Neste sentido, Loureiro & Monteiro (2005) verificaram 80% de mortalidade em formigas *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae), quatro dias após serem banhadas com o tratamento contendo um os entomopatógenos (*B. bassiana*, isolados AM 9 e JAB 06, e *M. anisopliae*, isolados E 9 e AL, nas concentrações de $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹).

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (produtos Biometha WP Plus[®], Biovéria G[®], Boveril WP[®], Metarril WP[®] e Metiê WP[®] nas concentrações de $1,0 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹, 5×10^9 conídios.mL⁻¹ e 10×10^9 conídios.mL⁻¹) pulverizados sobre pupas de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), reduziram a sobrevivência das fêmeas desta espécie, mas a progênie e o parasitismo desse parasitoide não foram afetados (ROSSONI et al. 2013).

No presente estudo *B. thuringiensis* (Thuricide[®]) na concentração 1×10^8 conídios.mL⁻¹ não reduziu a sobrevivência das abelhas *A. mellifera* em comparação com as abelhas testemunhas (40% de mortalidade após 167,24 h em contato com este entomopatógeno). Por outro lado Dipel[®] (na concentração 0,25g/100mL de água) causou 62,2% de mortalidade nas abelhas operárias após 96 horas da pulverização, segundo observado por Brighenti et al. (2007). A técnica de pulverização direta permite maior concentração de conídios aderidos no corpo dos insetos, promovendo maior mortalidade comparando as demais formas de aplicação por contato.

Thuricide[®] pulverizado (na concentração de 0,3g/100mL de água) sobre operárias de *A. mellifera* não interferiu na sobrevivência das abelhas, que foi de 66,67 horas, enquanto da respectiva testemunha foi de 77,80 horas (SIMIONATTO, 2013).

Para evitar o contato dos polinizadores com os entomopatógenos durante a aplicação desses produtos, os agricultores devem preferencialmente, realizar as aplicações no final da tarde, em períodos em que a taxa de forragimneto é menor. É necessário também fechar a colmeia, evitando assim, a contaminação (XAVIER, 2009).

3.6.2 Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em superfície vítrea

Os três entomopatógenos (*M. anisopliae*, *B. thuringiensis* e *B. bassiana*) testados no presente trabalho interferiram na sobrevivência das abelhas *A. mellifera* (Tabela 1).

B. bassiana foi o entomopatógeno que ocasionou maior mortalidade das operárias de *A. mellifera* (92%), após 97,3 horas em contato com esse micro-organismo (Figura 2B).

Embora não sejam relatados estudos sobre efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera* quando pulverizados em superfície vítrea, alguns trabalhos foram realizados verificando ação desses micro-organismos com outros insetos.

B. bassiana e *M. anisopliae* (Esalq 447 e E9, respectivamente), pulverizados na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios mL⁻¹ em gaiolas plásticas circulares (6,5 cm de diâmetro x 7,5 cm de altura), não provocam alteração significativa na sobrevivência/longevidade do parasitoide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) (SANTOS JUNIOR et al., 2006).

M. anisopliae (isolado IBCB 121) provocou efeito letal sobre adultos de *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) quando aplicado em placas de petri com papel filtro. No entanto, o fungo *B. bassiana* (isolado IBCB 66) não interferiu na sobrevivência de *O. insidiosus* (LOUREIRO & JUNIOR, 2007).

Adultos do parasitoide *C. flavipes* foram expostos ao fungo *M. anisopliae* (isolados UFGD 05, IBCB 348 e IBCB 425, concentrações de $1,0 \times 10^7$; $0,5 \times 10^8$; $1,0 \times 10^8$; $0,5 \times 10^9$ e $1,0 \times 10^9$ conídios mL⁻¹) através de tubos de plástico, contendo uma porção de papel filtro inoculado com 1 mL de suspensão e uma gota de mel. Os parasitoides expostos ao fungo IBCB 425 morreram no 7º dia após contato com o

entomopatígeno, o isolado IBCB 348 (concentração $1,0 \times 10^7$ conídios mL⁻¹) causou 100% de mortalidade após 6º dia em contato com o fungo. O isolado UFGD 05 na concentração de $0,5 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ e nas concentrações de $0,5 \times 10^9$, $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^7$ causaram mortalidade de 100% após o 10º dia em contato com o micro-organismo entomopatogênico (HAYASHIDA et al., 2012).

Os extratos vegetais podem apresentar efeito negativos sobre as abelhas (CINTRA et al., 2002), fato confirmado no presente trabalho. Outro fato importante observado foi que os extratos vegetais levaram algumas horas para ocasionarem mortalidade das abelhas, indicando que, após a volatização dos princípios ativos, os getais extratos vegetais permanecem menos tempo exercendo seu efeito tóxico sobre as abelhas.

3.6.3 Efeito dos entomopatógenos sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

Somente o entomopatígeno *B. bassiana* (Boveril® WP) interferiu negativamente na sobrevivência das abelhas, ocasionando 81% de mortalidade após 89,1 horas em contato com as folhas de soja contaminadas com esse produto.

Embora sejam inexistentes os estudos sobre o contato das abelhas *A. mellifera* com os entomopatógenos, no presente foi possível verificar o principal modo de ação dos fungos entomopatogênicos, que é por contato, agindo de maneira mais eficiente e rápida após contato do inseto com o entomopatígeno.

Verifica-se que o efeito do fungo entomopatogênico também está ligado à espécie e ao isolado utilizado, apresentando diferenças significativas em diferentes isolados da mesma espécie.

3.6.4 Efeito dos entomopatógenos, misturados à pasta Candi, sobre *A. mellifera*

Os entomopatógenos *B. bassiana* e *B. thuringiensis* reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera* ocasionando 57% e 53% mortalidade, após 117,3 h e 131,3 horas respectivamente, após a ingestão da dieta contaminada (Tabela 2).

Apesar de ter ocorrido redução na sobrevivência das abelhas, a média de sobrevivência das *A. mellifera* que ingeriram pasta Cândi com Boveril[®], é maior do que quando estas abelhas entram em contato com este produto.

O produto Thuricide[®], formulado a partir da bactéria *B. thuringiensis*, reduziu a sobrevivência das operárias adultas de *A. mellifera* no presente trabalho, ocasionando 53% de mortalidade após 131,3 horas.

Brighent et al. (2007) utilizou o produto Dipel[®] PM incorporado na pasta Cândi (0,25 e 1g do produto/60g), observou-se que o produto ocasionou 54% e 68%, respectivamente de mortalidade, nas operárias adultas de *A. mellifera*, após 96 horas de ingestão do produto. Enquanto nas concentrações de 10 e 20g do produto Dipel[®] PM incorporado à pasta Cândi, a mortalidade das operárias foi entre 94% a 100% em apenas 72 horas após o fornecimento da dieta contaminada. Após a ingestão de crescentes concentrações do produto o tempo letal médio foi diminuindo, ocasionando rápida ação do produto e redução na sobrevivência das abelhas.

Apesar da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* agir por ingestão e provocar mortalidade em diferentes insetos, em média, 48 horas após ingestão (MENDONÇA, 2002; CARVALHO et al. 2002; BRIGHENTI et al., 2007) no presente trabalho verificou-se que o produto Thuricide[®] não apresentou este efeito, sendo que 47% do total de *A. mellifera* ainda estavam vivas, após 131,3 horas.

Após o fornecimento da pasta Cândi com o produto comercial Dipel[®] PM (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g), Brighenti et al. (2007) verificaram alterações no comportamento das abelhas, perda de agilidade, e, as mesmas mantiveram-se isoladas durante a noite, bem como apresentaram paralisia geral antes de morrer. Também verificaram aumento de 20 a 30% no volume do abdome e fezes liquefeitas na parede das gaiolas, possivelmente ocasionadas por distúrbios intestinais, resultado que estes autores confirmaram após análises das fezes (método MBI obtendo o isolamento da bactéria *B. thuringiensis*) que identificou a passagem desta bactéria no trato intestinal da abelha.

Simionatto (2013), após fornecer o produto Thuricide[®] incorporado a Pasta Cândi, na concentração de 0,3g/100 mL verificou que o mesmo, não interferiu na longevidade média das operárias, que foi de 100,10 horas. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, em que este mesmo produto não interferiu na longevidade das abelhas, que foi de 131,3 horas.

Esta divergência nos resultados encontrados nos trabalhos realizados pode estar relacionada às diferentes concentrações utilizadas, ao isolado e as condições experimentais. No entanto, os resultados deste trabalho demonstram a ação patogênica dos micro-organismos sobre os insetos benéficos/abelha, embora seja um experimento laboratorial, no campo, os insetos estão suscetíveis ao contato com os entomopatógenos e possivelmente, vir a ocasionar a mortalidade.

3. 6. 5 Análise histológicas do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com entomopatógenos

Os entomopatógenos testados não ocasionaram alterações no comprimento das células do mesêntero das abelhas (Tabela 1). As abelhas operárias, alimentadas com pasta Cândi acrescida dos entomopatógenos *B. thurigiensies*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram comprimento das células do mesêntero de 102,3 µm (Figura 3 B), 83,2 µm (Figura 3 C) e 92,0 µm (Figura 3 D), respectivamente. Já as abelhas *A. mellifera* testemunhas alimentadas com pasta com cândi pura, apresentaram médias de 106,7 µm em suas células do mesêntero (Figura 3 A).

Não foram observadas diferenças ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos, no entanto foi possível visualizar alterações estruturais e qualitativas nas vilosidades, conforme a Figura 3.

Observa-se nas figuras 3B, 3C e 3D a redução na quantidade de células regenerativas, sendo que em ambos os casos não apresentam o ninho de células regenerativas, como observado nas figuras 3A. As células regenerativas apresentam a função de formar novas células funcionais e repor células perdidas ou velhas (CRUZ-LANDIM, 2009).

Neste sentido, a redução no número de células regenerativas interfere diretamente na reconstrução da parede do mesêntero, conseqüentemente na sua função de absorção, podendo também interferir na longevidade de *A. mellifera*. Fato que corrobora com os dados apresentados na Tabela 1, na qual os produtos Boveril® e Thuricide® interferiram negativamente na sobrevivência de *A. mellifera*.

O mesêntero, ventrículo ou estômago dos insetos está no intestino médio, que é o único órgão do trato digestório de origem endodérmica, sendo a região deste tubo onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos da

digestão. Nas abelhas, o mesêntero (canal alimentar), é um tubo cilíndrico, grosso e longo, localizado no interior da cavidade abdominal. A parede deste é formada pelo epitélio (constituído por células prismáticas) e por fibras musculares viscerais (CRUZ-LANDIM, 2009).

3.6 CONCLUSÕES

O entomopatógeno *B. bassiana*, (Boveril[®] WP) apresentou efeito negativo, reduzindo a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* nos quatro bioensaios testados (pulverização direta, ingestão de pasta Cândi incorporada, contato em superfície vítrea contaminada e folha de soja contaminada).

Os entomopatógenos *B. bassiana* (Boveril[®] WP), *B. thuringiensis* (Thuricide[®] WP) e *M. anisopliae* (Metarril[®] WP organic) não provocaram modificações morfométricas no mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi.

REFERÊNCIAS

ALVES, Sergio B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163p.

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

BRIGHENTI, Deodoro M.; CARVALHO, Cezar F.; CARVALHO, Geraldo A.; BRIGHENTI, Carla R. G.; CARVALHO, Sthepan 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, p.279-289, 2007.

BRAVO, Alejandra; LIKITVIVATANAVONG, Supaporn; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n.7, p.423-431, jul. 2011.

CARVALHO, E. M.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; SOUZA, B. Impacto de inseticidas fornecidos a adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) por meio de pasta Cândi contaminada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBA, 2002. p. 114.

CAPALBO, Deise M. F.; VILAS-BÔAS, Gislaine T.; ARANTES, Olivia M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 115-118, 2002.

COLOSIMO, Enrico A.; GIOLO, Suely R. (2006). **Análise de Sobrevivência Aplicada, Projeto Fisher-ABE-Blucher**. 355p.

CRUZ-LANDI Carminda da. **Abelhas: Morfologia e função dos sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408p.

GEWEKE, J. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments (with discussion). *In*: BERNARDO, J. M.; BERGER, J. O.; DAWID, A. P.; SMITH, A. F. M. (Ed.). *Bayesian statistics 4*. p.169-193. Oxford: Oxford University Press, 1992.

HAYASHIDA, Eduardo K.; KASSAB, Samir O.; FONSECA, Paula R. B. da; ROSSONI, Camila; LOUREIRO, Elisângela de S.; AMORIM, Luis. G. P. Efeito dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) sobre parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). **Nucleus**, v.9, n.1, p. 73-78 Abr. 2012.

HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research*, v. 31, n. 6, p. 1109-1144, 1983.

LOUZADA-NETO, F.; MAZUCHELLI, J.; ACHCAR, J.A. (2002). **Introdução à Análise de Sobrevivência e Confiabilidade**. III Jornada Regional de Estatística.

LOUREIRO, Elisângela S.; MONTEIRO, Antônio C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.4, p.553-561, 2005.

LOUREIRO, Elisângela de S.; JÚNIOR, Alcides M. Patogenicidade de Fungos Entomopatogênicos a *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **BioAssay**, 2007.

MALASPINA, Osmar; SOUZA, Tiago F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. *In*: **Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Apicultura e III de Meliponicultura**. Belo Horizonte, MG, Brasil. CD-Rom. 2008.

MENDONÇA, P. C. **Caracterização e sequenciamento dos plasmídeos pMC1 e pMC2 de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* isolado T01 328**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

POLANCZYK, Ricardo A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2004. 158f. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

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

PRAÇA, Lilian B.; BATISTA, Andréa C.; MARTINS, Érica S.; SIQUEIRA, Cláudia B.; DIAS, Daniel G.S.; GOMES, Ana C.M.M.; FALCÃO, Rosana; MONNERAT, Rose G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing,. 2008. (ISBN 3-900051-07-0). Acesso em: agosto 2013, Disponível em: <http://www.Rproject.org>.

ROSSI, Robson. M. **Introdução aos métodos Bayesianos na análise de dados zootécnicos com uso do WinBUGS e R**. Eduem, 2011. 191p

ROSSONI, Camila; KASSAB, Samir O.; LOUREIRO, Elisângela de S.; PEREIRA, Fabrício F.; COSTA, Daniele P.; BARBOSA, Rogério H. A exposição de pupas de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) compromete as características biológicas do parasitoide?. **XIII SINCONBIOL**, Bonito-MT, 2013.

SANTOS JÚNIOR, Hugo. J. G. dos; MARQUES, J. Edmilson; BARROS, Reginaldo; JUNIOR, Manuel. G. C. G.; ZAGO, Hugo B.; SILVA, Cinthia C.M. da. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre adultos de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 28, n. 2, p. 241-245, 2006.

SEBRAE- Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Agronegócio - Copa do Mundo de 2014 deve aumentar demanda pelo mel brasileiro Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae2014/Alertas/Copa-do-Mundo-de-2014-deve-aumentar-demanda-pelo-mel-brasileiro#.U3Ek4fldXg8>

SILVA, F. de A.S. S; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2012.

VEIGA, Marcelo M; SILVA, Dalton M; VEIGA, Lilian B. E; FARIA, Mauro V. de C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública** [online]. 2006, vol.22, n.11, pp. 2391-2399.

WOLFF, Luis F. REIS, Vanderlei D. A. dos; SANTOS, Régis S.S. dos. Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2008. 38p.

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

XAVIER, Vânia. **Impacto de Inseticidas Botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae)**. Dissertação de Mestrado. Viçosa: UFV. 2009. 43p.

4 CAPÍTULO II – EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS sobre *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Efeito de extratos vegetais sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

4.1 RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de extratos vegetais sobre *Apis mellifera* L.. A exposição das operárias de *A. mellifera* aos extratos vegetais foi realizada usando-se técnicas de pulverização direta, dieta contaminada e contato em superfície tratada (folhas de soja). Para isto, foram estabelecidos cinco tratamentos: água destilada esterilizada (testemunha), extrato aquoso de Chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*), Camomila (*Matricaria recutita*), Manjerona (*Origanum majorona*) e Romã (*Punica granatum*), na concentração de 5%. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com 20 abelhas por repetição, sendo cada abelha uma unidade experimental. As operárias de *A. mellifera* submetidas aos tratamentos foram acondicionadas em caixa gerbox e estas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 10\%$). A mortalidade/sobrevivência das operárias foi avaliada a partir de uma hora até às 240 horas, sendo os dados submetidos ao procedimento Bayesiano. As operárias mortas pela ingestão de pasta cãndi contaminada com os extratos vegetais foram separadas e selecionadas aleatoriamente para a retirada do mesêntero e posterior análise histológica, com avaliação quanti e qualitativa. Verificou-se que os extratos vegetais de Manjerona, Chapéu-de-couro, Romã e Camomila reduziram a sobrevivência das operárias de *A. mellifera* em todos os bioensaios. Os extratos vegetais Manjerona e Romã causaram modificações morfométricas, reduzindo o comprimento de células do mesêntero de *A. mellifera*. O extrato de Manjerona apresentou efeito negativo sobre *A. mellifera*, reduzindo a sobrevivência das operárias em todos os bioensaios em que foi avaliado, além de provocar alterações morfométricas nas células do mesêntero.

Palavras-chave : Controle Alternativo. Sobrevivência. Abelha

4.2 ABSTRACT

SILVA, Rita Tatiane Leão da. Effect of plant extracts on *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

This study aimed to evaluate the effect of plant extracts on *Apis mellifera* L..The exposure of workers bee of *A. mellifera* to the plant extracts were performed using techniques of direct spray, contaminated food, and contact with the treated surface (soybean leaves). Five treatments have been established: sterile distilled water (control), aqueous extract of Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*), Camomila (*Matricaria recutita*), Manjerona (*Origanum majorona*) and Romã (*Punica granatum*) at a concentration of 5 %. Each treatment consisted of five replications, with 20 bees per replicate, each bee as an experimental unit. The workers of *A. mellifera* under treatments were placed in gerboxes and these were placed in climate chamber type B.O.D. ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. de $60 \pm 10\%$). The mortality / survival of the workers were assessed from one hour to 240 hours, and the data submitted to the Bayesian procedure. The workers killed by the ingestion of contaminated Candi paste with plant extracts, were separated and randomly selected for the withdrawal of the midgut and subsequent histological analysis with quantitative and qualitative assessment. It has been found that the plant extracts of Manjerona, Chapéu-de-couro, Romã and Camomila reduced the survival of *A. mellifera* workers in all bioassays. The plant extracts Manjerona and Romã caused morphological changes by reducing the length of the midgut cells of *A. mellifera*. The Manjerona extract has presented negative effects on *A. mellifera*, reducing the survival of workers in all bioassays that has been reported, in addition to causing morphological changes in the cells of the midgut.

Keywords: Alternative Control. Survival. Bee.

4.3 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, a procura por alimentos aumentou significativamente e, conseqüentemente, o uso indiscriminado de inseticidas sintéticos, utilizados no para controlar insetos-pragas. Os inseticidas sintéticos utilizados no controle convencional apresentam riscos à saúde humana, através da ingestão de alimentos contaminados e através da contaminação do ambiente (GLIESSMAN, 2005).

Em contrapartida ao uso do controle convencional, o controle alternativo, por meio da utilização de produtos de origem natural, como extratos vegetais, apresenta-se como uma estratégia viável para a redução das populações de insetos-pragas (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

As plantas são ricas em substâncias que podem ser utilizadas no controle de insetos, através da produção de extratos destas plantas ou ainda na industrialização de produtos alternativos à base de plantas. Dentre as substâncias presentes nas plantas, destacam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (CASTRO, 2004).

Os compostos secundários extraídos das plantas com atividades inseticidas são destacados pelo fato de serem renováveis, facilmente degradáveis, não agredirem o ambiente e possivelmente não ocasionarem efeitos negativos sobre os organismos não alvos, como as abelhas, fato este que não está totalmente descartado (OLIVEIRA et al., 2007).

Apis mellifera (L.) (Hymenoptera: Apidae) é considerada inseto útil pelo fato de realizarem a coleta de pólen, néctar e água das plantas, principalmente das flores, auxiliando na polinização e promovendo rápida fecundação destas (COSTA-MAIA; LOURENÇO; TOLEDO, 2010). Além disso, produzem mel, própolis, cera e geleia real que também geram recursos aos apicultores.

Ao saírem da colmeia, as abelhas vão para o campo explorar o ambiente e, ao fazer este trabalho muitos entomopatógenos, partículas que estão no ar e resíduos de inseticidas e podem se aderir ao seu corpo e/ou serem ingeridos por estes insetos. Além disso, as operárias, ao retornarem para a colméia, podem carregar estes produtos, podendo contaminá-la, causar mortalidade das demais operárias, larvas, rainha, e ainda provocar a contaminação do mel e conseqüente intoxicação do homem (RIBEIRO; MARSICO; JESUS, 2010).

A fim de reduzir este tipo de contaminação, a utilização de extratos vegetais representa uma estratégia viável a ser utilizada nos sistemas alternativos de produção, para reduzir populações de insetos-praga (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

Vários extratos de plantas já foram avaliados sobre insetos, causando diversos efeitos, como inseticida e repelente em insetos de várias ordens (GUARIM-NETO; SANTANA; SILVA, 2000; ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002; SILVA JUNIOR, 2003; PINHEIRO & QUINTELA, 2004), mortalidade larval e a produção de pupas de tamanho desproporcional, que não completam o desenvolvimento (RIEDL et al., 2006), inibição do crescimento do inseto (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; TORRES et al., 2006), ação letal, ação fagodeterrente (SAITO et al., 2004; LUZ, 2007; KNAAK et al., 2012), distúrbios no desenvolvimento, deformações (GONZAGA et al., 2007, KNAAK et al., 2012), redução na fertilidade (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; KNAAK et al., 2012).

Embora a utilização de extratos vegetais para o controle de insetos-pragas seja menos agressiva ao meio ambiente, pouco se sabe do seu efeito sobre organismos não alvos como *A. mellifera*. Neste sentido, mesmo os extratos vegetais que são de origem natural, necessitam de estudos quando aos possíveis efeitos sobre organismos não alvos, como os polinizadores. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de extratos vegetais sobre *A. mellifera*.

4. 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) Apicultura, no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) e na Central de Análises da UTFPR, Câmpus Pato Branco (UTFPR-PB). Foram realizados três bioensaios, para avaliar os extratos vegetais Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Cham.& Schltl. Micheli Alismataceae), Camomila (*Matricaria recutita* L. Asteraceae), Manjerona (*Origanum majorana* L. Lamiaceae) e Romã (*Punica granatum* L. Punicaceae), sob diferentes formas de aplicação sobre *A. mellifera*.

4.4.1 Obtenção de *A. mellifera*

As operárias de *A. mellifera* africanizadas foram obtidas por meio de favos tipo Langstroth de cria operculada provenientes do Apiário Experimental da UNEPE Apicultura da UTFPR-DV. A seleção dos mesmos foi baseada na qualidade e quantidade de oviposição da rainha. Posteriormente estes quadros foram acondicionados em sacos de papel Kraft (60 cm x 70 cm com gramatura 50), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico, sendo mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $60 \pm 10\%$) para emergência uniforme das operárias, simulando o ambiente da colônia de origem. Após 24 horas realizou-se a coleta das abelhas (zero dia de idade) através do método de sucção, com o auxílio do tubo telado.

Para alimentação das abelhas foi preparada pasta Cândi, misturando-se 50 g de açúcar de confeitiro com 10 mL de mel puro, até formar uma massa homogênea.

4.4.2 Obtenção dos extratos vegetais para os bioensaios:

As plantas utilizadas para a obtenção dos extratos foram adquiridas em estabelecimento comercial de produtos naturais em Turvo, PR (Tabela 3). As mesmas encontravam-se secas e foram acondicionadas em sacos de papel Kraft (gramatura 50).

Tabela 3 - Nome comum, nome científico, família, e partes das plantas utilizadas para obtenção dos extratos vegetais avaliados nos bioensaios. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014.

Nome Comum	Nome Científico	Família	Parte da planta utilizada
Chapéu de couro	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham.& Schltld.) Micheli	Alismataceae	Folha
Camomila	<i>Matricaria recutita</i> L.	Asteraceae	Flor
Manjerona	<i>Origanum majorona</i> L.	Lamiaceae	Folha
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Folha

Essas plantas foram moídas em moinho de facas Tipo *Willie*, até granulometria de 0,5 milímetros (mm), obtendo-se um pó fino que foi armazenado em recipiente de vidro fechado, mantido em temperatura ambiente e protegido de luminosidade até seu uso na elaboração dos extratos. Como solvente extrator foi utilizada água destilada esterilizada, adicionando-se 5 g de pó em 100 mL de água, após os frascos foram vedados e envoltos em papel alumínio, permanecendo por 48h em ambiente escuro á temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada, em papel filtro duplo sobre um funil de Buckner conectado a um Kitasato acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm², sendo a solução final denominada extrato á 5%, armazenada em frascos esterilizados e fechados para posterior utilização nos bioensaios.

4.4.3 Bioensaio 1- Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre *A. mellifera*

Os tratamentos utilizados nos bioensaios 1 e 2 foram compostos por: pasta Cândi pura, pasta Cândi com extrato de Chapéu-de-couro, pasta Cândi com extrato de Camomila, pasta Cândi com extrato de Manjerona e pasta Cândi com extrato de Romã.

As operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO₂ por 120 segundos, foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, em grupos de 10 indivíduos. Cada grupo foi pulverizado com 1 mL do tratamento, utilizando-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante 1,2 kgf/cm². O mesmo procedimento foi realizado para todos os tratamentos/ repetições.

Cada duas caixas gerbox foram consideradas uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição (cada abelha foi considerada uma unidade experiemntal). As caixas foram vedadas com tecido tipo voil e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada, sendo umedecido periodicamente para evitar ressecamento, como alimento foi fornecido pasta Cândi pura. Essas caixas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. (27 ± 2°C, U.R. de 60 ± 10%).

A mortalidade das operárias foi avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas após o início da exposição das abelhas aos tratamentos, para estimar o período de sobrevivência de *A. mellifera* (adaptado de BAPTISTA et al., 2009), realizando a contagem dos insetos mortos.

4.4.4 Bioensaio 2- Efeito dos extratos vegetais sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

Duas folhas de soja, sem tratamento fitossanitário, foram coletadas e imersas por cinco segundos na solução de um dos extratos vegetais e, em seguida, foram colocadas em câmara de fluxo laminar horizontal para evaporação completa da solução com extrato vegetal. O mesmo procedimento foi realizado para todos os tratamentos/ repetições.

Posteriormente, estas folhas foram dispostas, em caixas gerbox. Os demais procedimentos, como delineamento experimental, acondicionamento e avaliação, foram realizados conforme descritos no bioensaio 1 (4.4.4).

4.4.5 Bioensaio 3- Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Cândi sobre *A. mellifera*

Os tratamentos foram compostos por: pasta Cândi pura, pasta Cândi com extrato de Chapéu-de-couro, pasta Cândi com extrato de Camomila, pasta Cândi com extrato de Manjerona e pasta Cândi com extrato de Romã.

As operárias de *A. mellifera*, previamente anestesiadas com CO₂ (120 segundos), foram transferidas para placas de Petri, em grupos de 10 abelhas. Cada duas caixas gerbox foram consideradas uma repetição, sendo o total de cinco repetições por tratamento, com 20 abelhas por repetição. As placas foram vedadas com tecido tipo *voil*, e sobre este foi fornecido um pedaço de algodão embebido em água destilada. Como alimento foi oferecido pasta Cândi incorporada com um dos extratos vegetais.

Para o preparo da pasta Cândi deste bioensaio, foi realizada uma mistura de 50 g de açúcar de confeitiro, 5 mL de mel puro e 5mL dos extratos vegetais (mesmo procedimento foi realizado com os demais extratos vegetais), até formar uma massa homogênea. Os demais procedimentos, como acondicionamento e avaliação, foram realizados conforme descritos no bioensaio 1.

4.4.6: Análise histológica do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi misturada com os extratos vegetais.

Para a realização das análises histológicas, foram removidos cinco mesêntero (ventrículo) por repetição/tratamentodas operárias alimentadas com pasta Cândi incorporada com os extratos vegetais e as respectivas testemunhas da etapa 4.4.5, totalizando 75 mesênteros removidos (Figura 4).

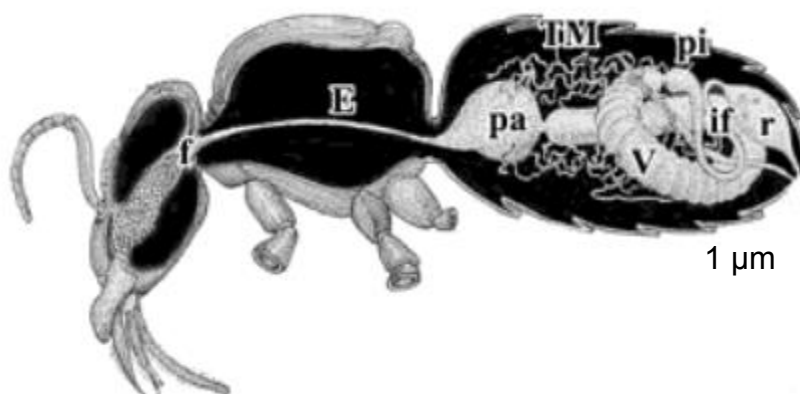


Figura 4 : Representação esquemática de uma seção longitudinal de uma operária de *Scaptotrigona postica* mostrando o sistema digestório. f=faringe; E=esôfago; pa=papo; V=ventrículo; pi=piloro; if=intestino fino; r=reto; TM=túbulo de Malpighi

Fonte: CRUZ-LANDIM (2009, p. 266).

Posteriormente, essas amostras foram fixadas em Fixador *Bouin* (250 mL de formaldeído 40% + 50 mL ácido acético glacial PA + 750 mL de solução saturada de ácido pícrico 1,4%) por 4 h, lavadas em álcool 70% (3 x 15 minutos) e armazenadas em álcool 70% até o processamento.

As amostras foram desidratadas por imersão em álcool em diferentes concentrações (álcool 80%: 10 minutos, álcool 90%: 10 minutos, álcool 95%: 10 minutos, álcool 98%: 10 minutos e álcool 100% I: 30 minutos, álcool 100% II: 30 minutos), sendo posteriormente diafanizadas por imersão em Xilol (Álcool/Xilol 1:1: 15 minutos; Xilol I: 30 minutos e Xilol II: 30 minutos). Na sequência realizou-se a parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1: 60 minutos; Parafina Histológica I: 12 horas e Parafina Histológica II: 2 horas) e o emblocamento em Parafina Histológica (Parafina Histológica/Cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo Rotativo Manual, em cortes de 2 a 7 micrometros (μm) de espessura, montados em lâmina de vidro de ponta fosca para microscopia (3,0 x 10,0 cm) contendo solução de albumina, sendo então assentados sobre chapa quente para distensão dos cortes. Na sequência, foram eliminados os resíduos de albumina e as lâminas permaneceram sete dias em estufa a 35 °C, para secarem completamente.

Os cortes foram corados pelo método H/E (Hematoxilina/Eosina), para isto foi realizado a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos, álcool 100% I: 2

minutos, álcool 100% II: 2 minutos) e a posterior reidratação destes (álcool 90%: 1 minuto, álcool 80%: 1 minuto, lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em Hematoxilina (4 minutos), lavados em água corrente (10 minutos), banhados em Eosina (2 minutos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em temperatura ambiente por três dias, para a secagem dos corantes, sendo, posteriormente, recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cm x 3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio de Luz Opton trinocular TNB-40T-PL, com câmera digital para captura de imagens, com auxílio do programa software ScopePhoto 2.04. Foi realizada avaliação quantitativa, mensurando-se a altura das células do mesêntero das abelhas e avaliação qualitativa, mensurando-se alterações teciduais, comparando os tecidos das operárias de *A. mellifera* alimentadas com os extratos vegetais com as operárias alimentadas com pasta Candi pura.

4.4.7 Análise Cromatográfica

Este trabalho foi realizado na Central de Análises da UTFPR, Câmpus Pato Branco (UTFPR-PB). Neste local, foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performande/Pressure Liquid Chromatografy* (HPLC) em fase reversa dos extratos, frações, subfrações e compostos isolados bioativos para análise dos extratos vegetais Chapéu-de-couro, Camomila, Manjerona e Romã, de acordo com o método adaptado de Francisco & Resurreccion (2009).

Foram injetados dez microlitros de cada amostra, em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de fluorescência e detector de arranjo de fotodiodos, coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 metros (m). A fase móvel utilizada foi água / ácido acético (0,1%, v/v) (solvente A) e metanol/ácido acético (0,1% v/v) (solvente B), com vazão constante de 1 mL/minuto. O gradiente iniciou com 5% do solvente B até 7% de B em 7 minutos, 17% de B em 75 minutos, 45% de B em 110 minutos, 70% de B em 117 minutos, 100% de B em 124 minutos e 5% de B em 129 minutos. A coluna foi mantida a temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando “*software*” específico.

Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, comparação do tempo de retenção quando o detector de fluorescência foi utilizado e cromatografia de padrões. Neste trabalho foram utilizados padrões autênticos de ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *trans-cinâmico*, ácido vanílico, ácido elágico, ácido salicílico, rutina, quercetina, ácido cafeico, ácido cumárico, procianidina B1, procianidina B2, epigallocatequina, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato e *trans-resveratrol*.

4.4.8 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado nos três bioensaios para análise de sobrevivência foi o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições cada, com 20 abelhas operárias, sendo cada abelha considerada uma unidade experimental. Foram utilizados os seguintes procedimentos: Frequentista não-paramétrico, frequentista paramétrico e Bayesiano através do pacote Survival do software R[®] (2013).

O comportamento da variável aleatória contínua, tempo de sobrevivência, $T \geq 0$, pode ser expresso através de várias funções matematicamente equivalentes, tais que, se uma delas é especificada, as outras podem ser derivadas. Entre elas tem-se: a

função densidade probabilidade, $f(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T \leq t + \Delta t)}{\Delta t}$, definida como o limite da probabilidade de um indivíduo experimentar o evento de interesse no intervalo de tempo $[t, t + \Delta t]$ por unidade de tempo tal que $f(t) \geq 0$ para todo $t \geq 0$ e área abaixo da curva igual a 1; a função de sobrevivência, $S(t) = P(T \geq t) = 1 - F(t)$, sendo $F(t)$ a função de distribuição

acumulada e, a função de risco, $h(t) = \frac{f(t)}{S(t)}$, utilizadas na prática para descrever os diferentes aspectos apresentados pelo conjunto de dados (LOUZADA-NETO, MAZUCHELI; ACHCAR, 2002).

Procedimento frequentista não-paramétrico

Estimativas empíricas da função de sobrevivência foram obtidas pelo método de KAPLAN e MEIER (KM), por meio do comando `survfit` da biblioteca `survival` do programa computacional R. Este estimador é também conhecido na literatura como estimador produto-limite e permite a presença de observações censuradas.

Sua expressão é dada por $S_{KM}(t) = \prod_{r, t_r < t} \frac{n_i - d_i}{n_i}$, onde t_r é o maior tempo de sobrevivência menor ou igual a t , n_i é o número de indivíduos vivos até o tempo t_i e d_i representa o número de mortes no tempo t_i , onde i pode ser qualquer valor inteiro entre 1 e r . Na ausência de censuras, $S_{KM}(t)$ se reduz a $S_{KM}(t) = \frac{\text{Nº de animais com tempos de sobrevivência } \geq t}{\text{Nº total de animais}}$.

Procedimento frequentista paramétrico

Estimativas dos parâmetros das funções densidade probabilidade consideradas para o erro aleatório, ϵ_{ij} , associado a cada observação, a saber: Exponencial, Weibull e Log-Normal foram obtidas por meio do comando `survreg` da biblioteca `survival` do R. As funções densidade de probabilidade, $f(t)$, a função de sobrevivência, $S(t)$ e o percentil $t_p = 100p\%$ da distribuição, são descritas a seguir:

Modelo Exponencial

$$f(t) = \frac{1}{\alpha} \exp\left\{-\frac{t}{\alpha}\right\}, \quad S(t) = \exp\left\{-\frac{t}{\alpha}\right\} \quad \text{e} \quad t_p = -\alpha \log(1-p).$$

Observação: Sua notação é $T \sim \text{Exp}(\alpha)$ e $\alpha > 0$ é o parâmetro de escala que representa a média da distribuição da variável aleatória T .

Modelo Weibull

$$f(t) = \frac{\gamma}{\alpha^\gamma} t^{\gamma-1} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\}, \quad S(t) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\gamma\right\} \quad \text{e} \quad t_p = \alpha \left[-\log(1-p)\right]^{\frac{1}{\gamma}}.$$

Observação: Sua notação é $T \sim W(\alpha, \gamma)$ e $\alpha > 0$ e $\gamma > 0$ são os parâmetros de

escala e forma, respectivamente. Caso $\gamma = 1$ se obtém a distribuição Exponencial como caso particular.

Modelo Log-Normal

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma t} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\log t - \mu}{\sigma}\right)^2\right\}, \quad S(t) = 1 - \Phi\left(\frac{\log t - \mu}{\sigma}\right) \quad e \quad t_p = e^{(\mu + \sigma Z_p)}$$

Onde: Z_p é o p -ésimo percentil da distribuição Normal padrão.

Observação: Sua notação é $T \sim LN(\mu, \sigma)$ e $-\infty < \mu < +\infty$ e $\sigma > 0$ são os parâmetros de escala e forma, respectivamente. Para discriminação entre modelos analisados, o valor de $-\text{LogL}$ ($-\log$ da verossimilhança) foi utilizado. Tal critério indica que melhores ajustes ocorrem quanto mais baixos seus valores forem. Para o melhor modelo ajustado, serão avaliadas as funções de sobrevivência e o percentil 50% (mediana) da distribuição, denominado tempo letal.

A verificação da significância do efeito de tratamento foi realizada por meio do teste Qui-quadrado e do modelo de Cox descrito por Colosimo & Giolo (2006) em nível de 5% de significância, respectivamente, via comando `survreg` e `coxph`, ambos da livreria `survival` do R.

Modelo Weibull: Foi considerado

Procedimento Bayesiano que o tempo de vida (dias) segue distribuição Weibull, isto é, $T \sim W(\alpha, \lambda)$, com $\alpha > 0$ e $\lambda > 0$, respectivamente, parâmetros de forma e escala, assumindo convenientemente a reparametrização sugerida Ibrahim, Chen e Sinha

(2001) tal que, $\lambda = \log\left(\frac{1}{\alpha^\gamma}\right)$, fazendo $\beta = e^\gamma = \frac{1}{\alpha^\gamma}$ e conseqüentemente $\alpha = e^{\left(\frac{-\log(\beta)}{\gamma}\right)}$. Foram consideradas a priori, distribuições não informativas para todos os parâmetros do modelo, isto é, $\lambda \sim N(0, 10^{-6})$ e $\gamma \sim \text{Gama}(10^{-3}, 10^{-3})$ (parametrização OpenBugs).

A obtenção das distribuições marginais a posteriori para os parâmetros foi por meio do pacote `BRugs` do programa computacional R. Como chutes iniciais para γ e λ foram considerados, respectivamente, o valor "1" e a estimativa frequentista. Foram gerados 1.100.000 valores em um processo MCMC, considerando um período de

descarte amostral de 100.000 valores iniciais. A amostra final de tamanho 11.000 foi formada após saltos de tamanho 100 de modo a eliminar a autocorrelação entre valores gerados no processo.

A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote coda do R, usando os critérios de Geweke (1992) e de Heidelberger & Welch (1983). Os parâmetros dos modelos, assim como os efeitos dos contrastes entre tratamentos foram considerados significativos, se seus respectivos intervalos com 95% de credibilidade para as médias a posteriori, não incluíram o valor zero (ROSSI, 2011).

Para realização das análises histológicas, os dados dos testes quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott Knott, com 5% de significância no programa Assistat (SILVA, 2012).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre *A. mellifera*

Os extratos vegetais de Chapéu-de-couro, Manjerona, Romã e Camomila, quando pulverizados sobre as operárias de *A. mellifera*, reduziram a sua sobrevivência, diferindo da testemunha (Tabela 4).

4.5.2 Efeito dos extratos vegetais sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

Todos os extratos vegetais diferiram da testemunha, no entanto, Manjerona (87,15 horas) e Camomila (92,30 horas) foram os extratos que ocasionaram maior redução na sobrevivência das abelhas *A. mellifera* (Figura 5B) 55% e 63% de mortalidade, respectivamente (Tabela 4).

4.5.3 Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Candi sobre *A. mellifera*

Os quatros extratos vegetais testados, reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera*, verificou-se que Romã e Manjerona foram os extratos que causaram maior redução na sobrevivência das abelhas operárias, causando 67% e 57% mortalidade deste inseto (Tabela 4), respectivamente, após 28, 24 horas e 35,40 horas da ingestão da dieta contaminada (Figura 5 C).

Tabela 4- Tempo letal (50%) de sobrevivida (Mediana) (Média \pm DP) de operárias de *Apis mellifera* (Estimativas Bayesianas do parâmetro de forma do modelo Weibull). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2014.

Efeito extratos vegetais pulverizados sobre <i>A. mellifera</i>		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	64%	80,91 \pm 8,19 a
Chapéu-de-couro	82%	42,72 \pm 4,46 c
Manjerona	78%	21,28 \pm 2,77 d
Romã	61%	56,96 \pm 5,70 b
Camomila	63%	58,03 \pm 6,50 b
<i>p</i>		<0,05
Efeito de extratos vegetais sobre <i>A. mellifera</i>, por contato em folhas de soja		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha (Água destilada esterilizada)	65%	129, 26 \pm 6,58 a
Chapéu-de-couro	64%	115,13 \pm 6,64 b
Manjerona	55%	87,15 \pm 6,56 e
Romã	70%	106, 78 \pm 6,71c
Camomila	63%	92,30 \pm 6,77d
<i>p</i>		< 0,05
Efeito de extratos vegetais misturados à pasta Cândi, sobre <i>A. mellifera</i>		
	% mortalidade	Sobrevivência (horas)
Testemunha	61%	126,83 \pm 7,69 a
Chapéu-de-couro	73%	79, 32 \pm 5,13 c
Manjerona	57%	35,40 \pm 2,31 d
Romã	75 %	28,24 \pm 1,97 e
Camomila	58%	92,44 \pm 8,33 b
<i>p</i>		< 0,05

a,b,c,d,e Letras distintas na coluna, indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do contrastes Bayesianos em nível de 95% de credibilidade.

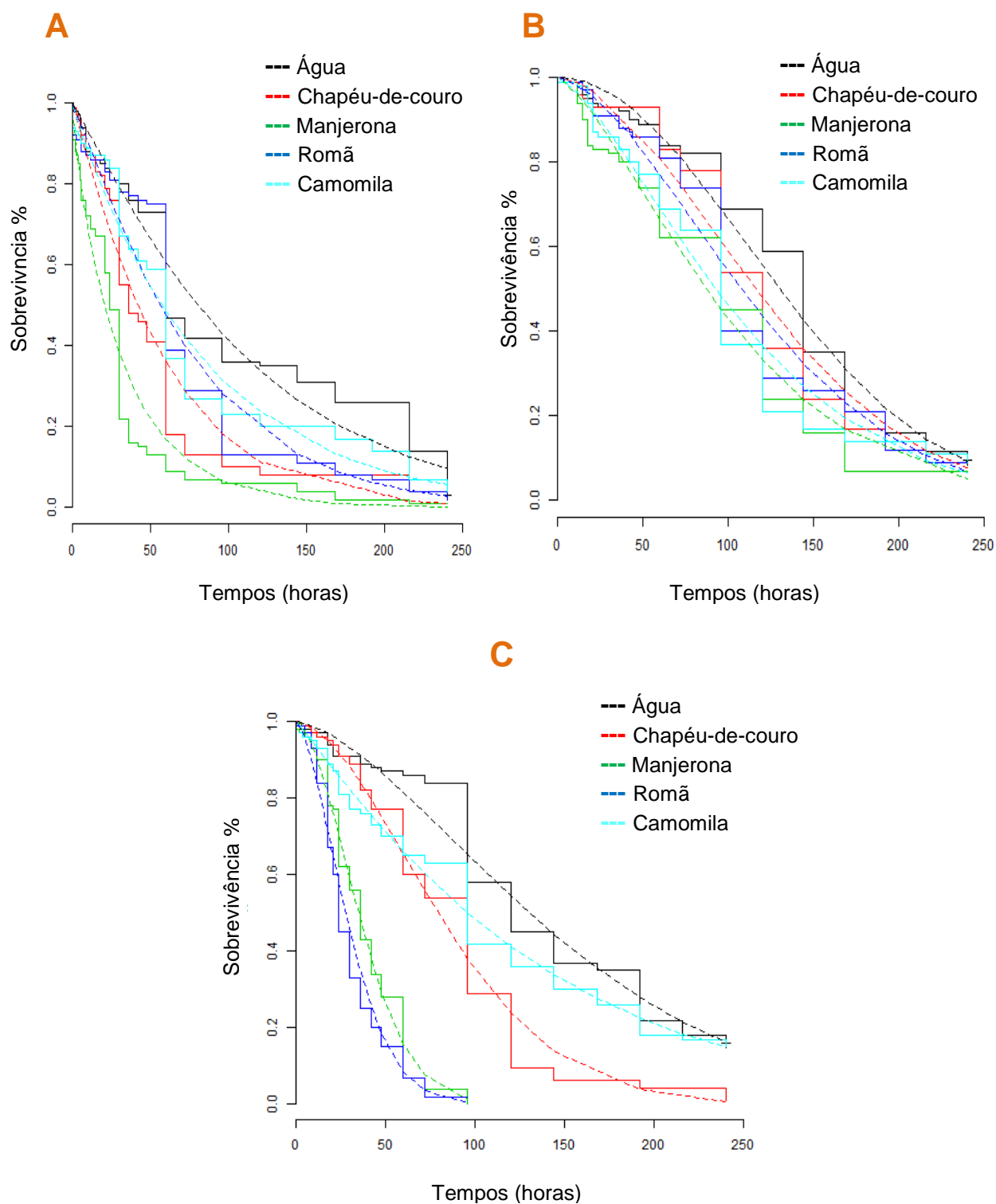


Figura 5: Curva de sobrevivência (horas) de *A. mellifera*. A) Pulverização dos extratos vegetais B) Contato com folhas de soja contaminadas com os extratos vegetais e C) Ingestão de pasta cãndi misturada com os extratos vegetais, teste de sobrevivência Kaplan-Meier vs Weibull ajustadas aos tempos (horas). Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$.

4 5.4 Análise histológica do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com extratos vegetais

As operárias de *A. mellifera*, alimentadas com a pasta cândi incorporada com os extratos vegetais de Camomila e Chapéu-de-couro não tiveram o comprimento das células do mesêntero (ventrículo) alteradas, quando comparados ao comprimento das células do mesêntero das abelhas alimentadas com pasta Cândi pura (testemunha) (Tabela 5). As abelhas alimentadas com a pasta Cândi misturada com os extratos de Manjerona e de Romã tiveram o comprimento das células do mesêntero alteradas (Figura 5A e 5B).

Tabela 5 - Comprimento (μm) (\pm DP) das células do mesêntero (ventrículo) de operárias de *Apis mellifera* após alimentação com pasta Cândi misturada com os extratos vegetais. Temperatura 27 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $60 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2014.

Tratamento	Células do mesêntero μm
Testemunha	$109,7 \pm 6,09$ a
Chapéu-de-couro	$99,3 \pm 5,34$ a
Manjerona	$78,3 \pm 6,67$ b
Romã	$71,8 \pm 10,01$ b
Camomila	$110,8 \pm 15,32$ a
CV%	8,73

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$).

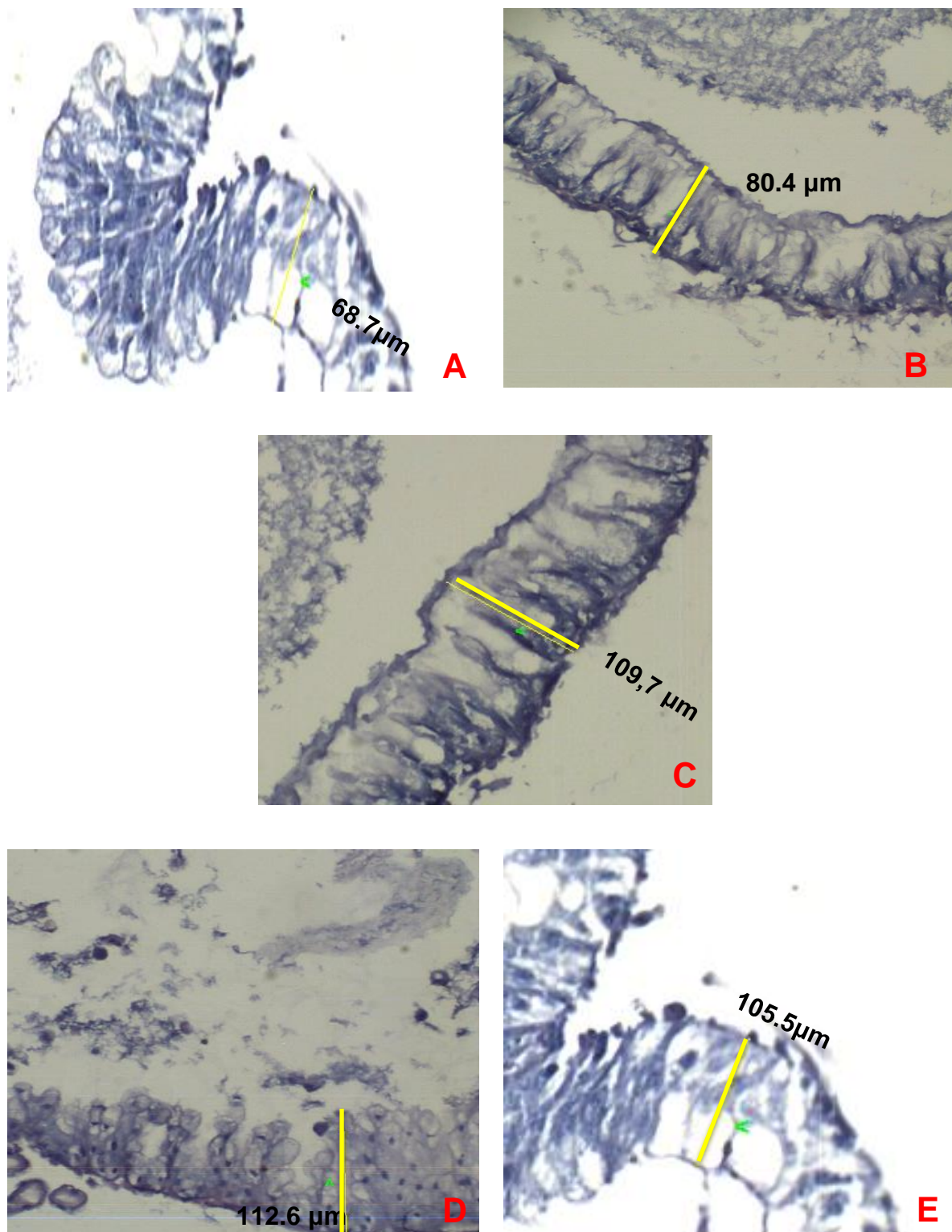


Figura 6. Fotomicrografia do mesêntero (ventrículo) de *A. mellifera* (microscópio de luz opton trinocular tnb-40t-pl, com câmera digital para captura de imagens utilizando uma objetiva de aumento de 10 \times) alimentadas com: A) Pasta cãndi e Romã; B) Pasta cãndi e Manjerona; C) Pasta cãndi pura; D) Pasta cãndi e Camomila e E) Pasta cãndi e Chapéu-de-couro.

4.5.5 Análise cromatográfica

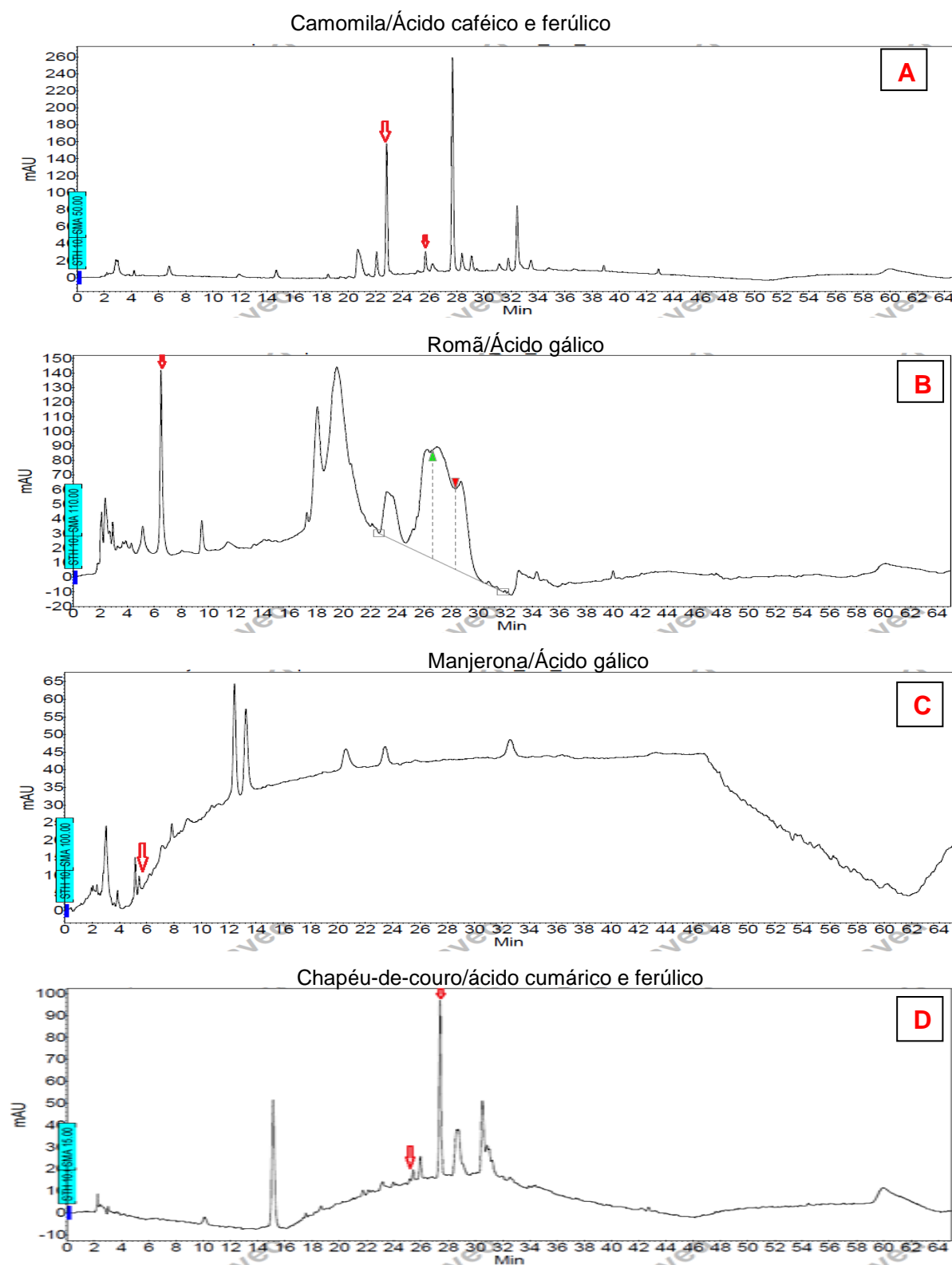


Figura 7: Análise cromatográfica (CLAE) do extrato de: A) Camomila, B) Romã, C) Manjerona e D) Chapéu-de-Couro. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR, 2014.

4.6 DISCUSSÃO

4.6.1 Efeito dos extratos vegetais pulverizados sobre *A. mellifera*

Os quatros extratos tesados reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera*, sendo Manjerona o extrato que ocasionou maior mortalidade (42%) em um curto período de tempo 21, 28 h.

Porém, informações referentes ao efeito de extratos vegetais aplicados diretamente sobre operárias de *A. mellifera* não estão disponíveis na literatura.

4.6.2 Efeito dos extratos vegetais sobre *A. mellifera*, por contato em folhas de soja

Os extratos de Chapéu-de-couro, Romã, Camomila e Manjerona reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera* (Tabela 4).

Manjerona e Camomila causaram maior redução na sobrevivência das abelhas 87,5 e 92,3 horas respectivamente, diferindo dos demais tratamentos. Esse resultado pode estar associado à ação inseticida dos extratos vegetais ocorre nas primeiras horas, onde o princípio ativo esta mais concentrado, ocasionando assim rápida mortalidade, reduzindo a sobrevivência das operárias *A. mellifera*.

Os extratos vegetais podem apresentar várias substâncias que afetam o comportamento e metabolismo dos insetos (CARVALHO, 2008).

4.6.3 Efeito dos extratos vegetais misturados à pasta Cândi sobre *A. mellifera*

Os quatros extratos vegetais testados, interferiram na sobrevivência das abelhas *A. mellifera*, verificou-se que Romã e Manjerona (Tabela 4) reduziram a sobrevivência das abelhas, diferindo dos demais extratos.

Os extratos vegetais reduziram a sobrevivência das abelhas *A. mellifera* em laboratório, no entanto, no campo, esse efeito pode ser diferente, já que no laboratório o inseto esta em constante contato com o extrato, no campo muitas vezes o produto natural, podem não entrar em contato direto com as abelhas. No entanto, é importante

salientar que são necessários estudos em campo, avaliando assim os possíveis efeitos sobre as operárias de *A. mellifera*.

4. 6.4 Análise histológica do mesêntero de *A. mellifera* alimentadas com pasta Cândi incorporada com extratos vegetais

Verificou-se que somente os extratos de Manjerona e de Romã causaram redução no comprimento das células do mesêntero de *A. mellifera*, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 5), estes extratos apresentaram redução de 38 μm (Figura 6 B) e 31 μm (Figura 6 A), respectivamente, no comprimento das células do mesêntero.

Os tratamentos com extrato de Camomila 110,8 μm (Figura 6 D) e Chapéu-de-couro 99,3 μm (Figura 6 E), quando comparadas com a testemunha (Figura 6 C) não apresentaram redução no comprimento das vilosidades.

Os extratos vegetais de Camomila e Chapéu de couro, embora interfiram na sobrevivência da *A. mellifera*, não provocaram alterações histológicas/qualitativas no mesêntero, sendo, necessários novos estudos histológicos a fim de verificar a influência destes produtos naturais sobre as larvas de *A. mellifera*, a fim de respaldar a seletividade dos extratos testados no presente trabalho. Os demais extratos também não provocaram alterações qualitativas no mesêntero.

Em um estudo testando produtos fitossanitários naturais, Simionatto (2013), realizou teste quantitativo das células do mesêntero de *A. mellifera* (operárias adultas), verificando que não ocorreram alterações morfométricas no mesêntero destas abelhas, quando alimentadas com pasta Cândi incrementada com os produtos fitossanitários naturais Rotenat® (0,6 mL/1L), Natualho®(3mL/1L), Natuneem®(0,5 mL/1L), Pironat® (1mL/1L) e Calda Bordalesa (10g CuSO_4 + 10g de Ca(OH)_2 / 1L).

Algumas medidas podem ser implantadas visando o cuidado no momento da aplicação dos extratos vegetais, como a aplicação em horários em que as abelhas apresentam menor taxa de forrageamento, ou seja, no final da tarde onde a presença das abelhas nas lavouras é menor (XAVIER, 2009). Outra medida utilizada para reduzir a mortalidade das abelhas é o seu confinamento dentro das colmeias, a fim de reduzir a exposição desses insetos aos produtos utilizados, entretanto, deve-se oferecer alimento

e, principalmente, água em abundância, para permitir que as abelhas reduzam a temperatura no interior das colônias (FREITAS & PINHEIRO, 2012).

4.6.5 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica possibilitou a identificação de substâncias ativas presentes nos extratos vegetais. Identificou-se, no extrato aquoso de Camomila (Figura 12 A) a presença de ácido caféico e ferúlico, em concentrações de $0,89 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,15 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. A análise dos compostos obtidos no extrato aquoso de Romã (Figura 7B) identificou ácido gálico, concentração de $1,86 \text{ mg g}^{-1}$.

O ácido gálico apresenta toxicidade e causa efeitos nocivos aos insetos (SANTOS, et al., 2013). Estes autores verificaram que o extrato metanólico do pó de folhas de mandioca aplicado no protórax das formigas *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) com o auxílio de microseringa provocou efeito negativo na sobrevivência destas formigas ao longo do tempo, reduzindo a sobrevivência.

Neste extrato foi identificado ácido gálico ($35,00 \pm 0,42 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e catequina ($191,00 \pm 14,07 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), ao analisar o perfil cromatográfico (SANTOS et al., 2013).

As substâncias isoladas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão Anacardiaceae) (ácido gálico, a sua forma metilada, o galato de metila, o flavonoide glicolisado quercetrina e sua aglicona a quercetrina) incorporados na dieta de formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa*, apresentaram potencial inseticida sobre estas. Galato de metila provocou 50% de mortalidade em *A. sexdens* no 11º dia, a quercetrina provocou mortalidade de 50% no 3º dia, já a quercetina e o ácido gálico provocaram 50% de mortalidade apenas ao final dos bioensaios (BENDASSOLLI et al., S.a.).

A mortalidade das formigas *A. sexdens rubropilosa* e das operárias de *A. mellifera*, ocorreram devido à presença de substâncias fenólicas, tóxicas aos insetos, como por exemplo, o ácido gálico, também identificado no extrato empregado nesse experimento.

No extrato de Manjerona (Figura 7C) verificou-se a presença de ácido gálico em concentração de $0,10 \text{ mg g}^{-1}$ e, no extrato de Chapéu-de-couro (Figura 7 D) obteve-se ácido cumárico ($0,01 \text{ mg g}^{-1}$) e ácido ferúlico ($0,37 \text{ mg g}^{-1}$).

Os ácidos, encontrados nos extratos vegetais analisados são classificados como compostos fenólicos, os quais podem apresentar diversas reações nos insetos, como atividade inseticida e em alguns casos inibição da alimentação e desenvolvimento (TELLES, 2014).

A ingestão de compostos fenólicos por *Malacosoma disstria* Hübner (Lepidoptera: Lasiocampidae), causou estresse oxidativo no conteúdo do lúmen do intestino médio, aumento do estresse oxidativo nos tecidos do intestino e formação de lesões no mesmo (BARBEHENN; MABEN; KNOESTER; 2008).

As principais famílias que produzem substâncias inseticidas são as famílias Canellaceae, Labiatae, Annonaceae, Asteraceae, Rutaceae e Meliaceae (LUCCA, 2009).

Sendo que Camomila, da família Asteraceae, utilizada no presente estudo, provocou redução na sobrevivência das *A. mellifera* após contato com as folhas de soja contaminadas com esse extrato vegetal, provavelmente Camomila interferiu na sobrevivência das abelhas, entretanto esse extrato não provocou alterações morfológicas nas células do mesêntero das operárias de *A. mellifera*.

O conhecimento a cerca dos efeitos de extratos vegetais sobre insetos benéficos são escassos, sobretudo no que se refere à identificação de compostos com potencial inseticida, que provocam a mortalidade dos organismos não alvos, como as abelhas. É oportuno salientar, que pesquisas identificando quais os extratos vegetais são seletivos aos organismos não alvos, em especial sobre os polinizadores, como as abelhas.

4.7 CONCLUSÕES

Os extratos vegetais de Manjerona, Chapéu-de-couro, Romã e Camomila reduziram a sobrevivência das operárias de *A. mellifera* em todos os bioensaios.

Os extratos vegetais Manjerona e Romã causaram modificações morfométricas, reduzindo o comprimento de células do mesêntero de *A. mellifera*.

O extrato de Manjerona apresentou efeito negativo sobre *A. mellifera*, reduzindo a sobrevivência das operárias em todos os bioensaios em que foi avaliado, além de provocar alterações morfométricas nas células do mesêntero.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Ulysses P. de; ANDRADE, Laise de H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, n.3, v.16, 2002, p.273-285.

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

BARBEHENN, R Raymond V.; MABEN, Rosalyn E.; KNOESTER, Jennifer J. Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a treefeeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera:Lasiocampidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 37, n. 5, p. 1113-1118, 2008.

BENDASSOLLI, Rodney, H.; SARRIA, André L. F.; FERNANDES, João, O.; BUENO, Odair, C.; BARBOSA, Amanda, O.; VIEIRA, Paulo, C.; SILVA, Maria, F. G. F. Atividade Inseticida de Substância Isoladas de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), Para o Controle de Formigas Cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*). **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Sorocaba – São Paulo.S.p. S.a.

CARVALHO, T. M. B. Avaliação de extratos vegetais no controle de *Brevipalpus phoenicis* (Gejkses, 1939) e *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917) (Acari: Tenuipalpidae, Tetranychidae) em cafeeiro. 2008. 101 p. **Dissertação** (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CASTRO, Daniele P.; **Atividade inseticida de óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum***. Minas Gerais, 2004. 87p. **Dissertação** (Pós-graduação em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras.

CAVALCANTE, Giani M. MOREIRA, Albert F. C. VASCONCELOS, Simão D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasília, v.41, n.1, p.9-14, jan. 2006.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. (2006). *Análise de Sobrevivência Aplicada*, Projeto Fisher-ABE-Blucher. 355p

COSTA-MAIA, Fabiana M.; LOURENÇO, Daniela A. L.; TOLEDO, Vagner A. A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. In: MARTIN, T.N.; WACLAWOVSKY, A.J.; KUSS, F.; MENDES, A.S.; BRUN, E.J. (Org.). **Sistemas de Produção Agropecuária - (Ciências Agrárias, Animais e Florestais)**. Dois Vizinhos (PR): UTFPR, 2010, Cap.3, p. 45-67.

CRUZ-LANDI Carminda da. **Abelhas: Morfologia e função dos sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408p.

FRANCISCO, Maria, L. D.; RESSURREICCIÓN, A. V. A. Development of a far reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 356-363, 2009.

FREITAS, Breno M.; PINHEIRO, José N.; **Polinizadores e Pesticidas: Princípios de Manejo para os Agroecossistemas Brasileiros**. Brasília: MMA, 2012. 112 p.

GEWEKE, J. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments (with discussion). In: BERNARDO, J. M.; BERGER, J. O.; DAWID, A. P.; SMITH, A. F. M. (Ed.). *Bayesian statistics 4*. p.169-193. Oxford: Oxford University Press, 1992.

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

GONZAGA, Adriana D.; SOUZA, Silas G. A. de.; PY-DANIEL, Victor.; RIBEIRO, Joana D., Potencial de manipueira de mandioca (*Manihot esculente* Crantz) no controle de

pulgão preto de citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy, 1907). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2,n.2. out. 2007.

GUARIM-NETO, Germano; SANTANA, Santana R.; SILVA, Josefa V. B. da. Notas etnobotânicas de espécies de *Sapindaceae* Jussieu. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.14, n.3, 2000, p.327-334.

HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research*, v. 31, n. 6, p. 1109-1144, 1983.

KNAAK, Neiva; TAGLIARI, Marines S.; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia M. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas Mediciniais Sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, Londrina, v.7,n.1, p.1-6, 2012.

LOUZADA-NETO, F.; MAZUCHELLI, J.; ACHCAR, J.A. .Introdução à Análise de Sobrevivência e Confiabilidade. III Jornada Regional de Estatística (2002).

LUCCA, Patrícia S.; Potencial inseticida de extratos de Funcho, Erva-doce, cravo-da-índia e do preparado homeopático para o controle de pulgão em couve. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil, 2009.

LUZ, Francisco J. F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

OLIVEIRA, Marcelo S.S.; ROEL, Antonia R.; ARRUDA, Eduardo J.; MARQUES, Ana S. Eficiência de Produtos Vegetais no Controle da Lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 326-331, mar./abr., 2007.

PINHEIRO, Patricia V.; QUINTELA, Elaine D. **Efeito de extratos de plantas sobre a mortalidade de ninfas de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Comunicado Técnico: Embrapa, Santo Antônio de Goiás – GO, 2004, p.1-4.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. (ISBN 3-900051-07-0). Acesso em: agosto 2013, Disponível em: <http://www.Rproject.org>.

RIBEIRO, Roberta; O.R.; MÁRSICO, Elaine T.; JESUS, Edgar F.O. **Elementos traço em méis de abelhas (*Apis mellifera*) do estado do Rio de Janeiro, Brasil: Influência da sazonalidade**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2010.

RIEDL, Helmut; JOHANSEN, Erik; BREWER, Linda; BARBOUR, Jim. How to reduce bee poisoning from pesticides. PNW (Pacific Northwest Extension) 591, Corvallis: Oregon State University, 2006. 26p.

ROSSI, Robson. M. **Introdução aos métodos Bayesianos na análise de dados zootécnicos com uso do WinBUGS e R**. Eduem, 2011. 191p.

SAITO, Maria L.; POTT, Arnildo; FERRAZ, José M.G.; NASCIMETO, Roseli S. Avaliação de Plantas com Atividade Deterrente Alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, p.1-10, jan./dez. 2004.

SANTOS, Mirim A. I.; CORRÊA, Angelita D.; ALVES, Ana P. DE C.; SIMÃO, Anderson A.; ALVES, Dejene S.; OLIVEIRA Rodrigo L. de; SACZK, Adelir A.; CARVALHO, Geraldo A. Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3501-3512, 2013.

SILVA JUNIOR, Antonio A. Essentia herba – **Plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, v.1. 2003. 441 p.

SILVA, F. de A. S. **ASSISTAT** versão 7.6 beta (2012). Campina Grande-PB: Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Campina.

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

TELLES, Aline M. dos S. **Efeito de Extratos Vegetais sobre *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé) (Hemiptera: Thaumastocoridae)**, 2014, 40f. Trabalho Conclusão de Curso – Bacharelado em Engenharia Florestal, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2014.

TORRES, Adalci L.; BOIÇA JUNIOR, Arlindo L.; MEDEIROS, Cesar A.; BARROS, Reginaldo. Efeito de Extratos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no Desenvolvimento e Oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.3, p.447-457, mai. 2006.

XAVIER, Vânia. M. **Impacto de inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 43 f. Dissertação (Magister Scientiae), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de entomopatógenos e extratos vegetais constituem uma alternativa viável ao uso de inseticidas sintéticos no controle de insetos praga. No entanto, tem-se a preocupação do efeito destes agentes sobre organismos não alvos, em especial sobre os polinizadores, como as abelhas.

No presente estudo foram observados, que *B. bassiana* (Boveril[®] WP) e o extrato vegetal de Manjerona foram os produtos que ocasionaram redução na sobrevivência das operárias de *A. mellifera*. Contudo, sugere-se a realização de novos experimentos que avaliem os efeitos desses produtos sobre as abelhas no campo e sobre a colmeia. Além disso, avaliar o potencial inseticida e o potencial repelente sobre operárias de diferentes idades, como a fase larval, a fim de garantir à segurança às abelhas ao aplicar esses produtos.