

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

**ADRIANE CRISTINA ZANON**

**EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE SOBRE A QUALIDADE  
REPRODUTIVA DE RAINHAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:  
APIDAE) AFRICANIZADAS**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2015**

**ADRIANE CRISTINA ZANON**

**EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE SOBRE A QUALIDADE  
REPRODUTIVA DE RAINHAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:  
APIDAE) AFRICANIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup> Dra. Michele Potrich

Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

PATO BRANCO

2015



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



### TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n.º 118

*Efeito de agentes de controle sobre a qualidade reprodutiva de rainha de Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas*

por

**Adriane Cristina Zanon**

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de maio do ano de dois mil e quinze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadores:

  
Prof.ª Dra. Natalia Ramos Mertz  
UNICENTRO

  
Prof.ª Dra. Fabiana Martins Costa Maia  
UTFPR/Dois Vizinhos

  
Prof.ª Dra. Michele Potrich  
UTFPR/ Dois Vizinhos

  
Prof. Dr. Alfredo de Gouveia  
UTFPR/ Dois Vizinhos  
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Giovani Benin  
Coordenador do PPGAG

Dedico este trabalho a minhas duas lindas filhas, Bruna e Barbara, pessoinhas que mais amo no mundo e é por elas que faço tudo em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder toda força espiritual necessária para completar esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa, pelas orientações, incentivo e paciência durante todo o processo de aprendizado.

À Prof<sup>a</sup> Dra, Michele Potrich, co-orientadora, pelas orientações, que foram tantas quantas eu necessitei, sempre se mostrando disponível e acessível, pela amizade, apoio, agilidade na conclusão de todas as atividades pertinentes ao programa e ajuda em todos os processos realizados durante o estudo.

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

À Prof<sup>a</sup> Dra Fabiana Martins Costa Maia, por me fazer conhecer melhor o mundo das abelhas e ter mais respeito por elas, auxílio na elaboração da metodologia a ser aplicada e ajudar e disponibilizar a equipe da UNEPE Apicultura os trabalhos realizados a campo.

Ao Prof. Dr Edgar S. Vismara e Prof<sup>a</sup>. Michele Potrich, pelas orientações e auxílio nas interpretações das análises estatísticas.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico, Dieli Simionatto, Aline Mara Telles, Sidinei Dallacort, Flávia Tedesco, Matheus Padilha, Jackeline Lima e Fernanda Colombo, a todos que foram muito importantes para todos os trabalhos necessários para a condução do experimento.

À Marisa Clemente Rodrigues pelas orientações sobre as abelhas, pela sua simpatia e alegria em dividir seus enormes conhecimentos sobre suas amadas abelhas.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Dois Vizinhos/PR em nome do Diretor Geral Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa.

A todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e colaboraram para a conquista deste objetivo, mas principalmente a Ivanete Linke, cunhada, comadre, mas principalmente amiga, que sempre me incentivou e motivou a trilhar este caminho, me motivando sempre a continuar,

Muito, Muito Obrigado!!!

## RESUMO

ZANON, Adriane Cristina. Efeitos de agentes de controle sobre a qualidade reprodutiva de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas. 90F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

A agricultura com a utilização de produtos com menor impacto ambiental está em expansão. Nela, os produtores disponibilizam seus produtos sem a utilização de insumos químicos sintéticos, solucionando os problemas fitossanitários com o uso de agentes de controle biológico ou alternativo, como parasitóides, predadores, entomopatógenos, produtos alternativos, extratos vegetais e óleos essenciais. Estes produtos podem ser considerados seguros aos organismos não-alvos, mas estudos são necessários para constatar estas características sobre os inimigos naturais e sobre os insetos benéficos, como as abelhas, freqüentadoras comuns das culturas. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de controle sobre a qualidade reprodutiva de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas. Para isto, foi testada a ação dos produtos de controle sobre a produção de rainhas de *A. mellifera*, utilizando o fungo entomopatogênico comercial Boveril®  $1,0 \times 10^8$  (*Beauveria bassiana*) e extrato aquoso de Romã (*Punica granatum*) na concentração de 5%, água destilada esterilizada com Tween® (0,01%) e água destilada esterilizada (testemunhas). Os tratamentos foram incorporados em um tecido tipo gaze, envolto em uma placa de acrílico e acondicionados no interior de colônias tipo minirrecrias, sendo que assim as operárias entraram em contato com o agente testado. No dia seguinte foram introduzidos sarrafos com 30 cupulas com larvas para produção de rainhas. A partir da emergência de todas as rainhas, estas foram monitoradas, para a determinação das medidas do peso vivo (mg), comprimento e largura de asa e abdome, comprimento, largura e altura do tórax (mm) bem como o horário da emergência das rainhas. Na etapa seguinte foram avaliadas a influência dos agentes de controle na produção de cria, realizando as mensurações das áreas de cria em  $\text{cm}^2$ , por seis semanas seguidas. Verificou-se que a área de cria das rainhas não diferiram entre os tratamentos avaliados. Também foram realizadas análises histológicas das glândulas hipofaríngeas das operárias que entraram em contato com os agentes de controle e do mesêntero das

rainhas virgens. Na análise histológica não foram observadas diferenças nos tecidos quando os tratamentos foram comparados com as respectivas testemunhas.

**Palavras-chave:** Organismo não-alvo. Controle biológico. Abelha africanizada.  
Extratos vegetais.

## ABSTRACT

ZANON, Adriane Cristina. Efeito de agentes de controle sobre a qualidade reprodutiva de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas. 90F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

The agriculture with the use of products with less environmental impact is expanding. In it, the producers offer their products without the use of synthetic chemical inputs, solving the phytosanitary problems with the use of biological or alternative control agents such as parasites, predators, entomopathogenic, alternative products, plant extracts and essential oils. These products can be considered safe to non-target organisms, but studies are needed to find these features on natural enemies and on the beneficial insects such as bees, common frequenter of cultures. In this sense, this study aims to evaluate the effects of control over reproductive quality queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Africanized. For this, it tested the action of control products on the production of *A. mellifera* queens, using the commercial entomopathogenic fungus Boveril® 1,0x10<sup>8</sup> (*Beauveria bassiana*) and aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum*) at a concentration of 5% sterile distilled water with Tween (0.01%) and sterile distilled water (controls). The treatments were incorporated into a tissue type gauze, wrapped in an acrylic plate and packed inside minirrecrias type colonies for the production of queens on the day before the transfer of larvae. The next day were introduced battens with 30 domes with larvae to produce queens, so the workers have contacted the agent tested. From the emergence of all the queens, they were monitored to determine the measures of body weight (mg), length and width of wing and abdomen, length, width and height of the chest (mm) as well as the time of emergence of queens. The next step was evaluated the influence of the control agents in production creates, performing measurements of creating areas in cm<sup>2</sup> for six straight weeks. It was found that the area creates Queens did not differ among the treatments. Histological analysis of hipofaringeanas of workers glands that came into contact with the control agents and the midgut of virgin queens were also held. Histological analysis differences were observed in the tissues when the treatments were compared with the respective controls.



**Keywords:** non-target organism. Entomopathogenic microorganisms. Africanized honey bee. Vegetable extracts.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aceitação das realeiras de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com os agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.....	49
Tabela 2 - Peso ( $\pm$ EP) a emergência de rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.....	52
Tabela 3 - Tempo de emergência ( $\pm$ EP) de rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015. ....	53
Tabela 4 - Comprimento ( $\pm$ EP) e largura ( $\pm$ EP) da asa e abdome das rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinho, 2015.....	54
Tabela 5 – Comprimento ( $\pm$ EP), largura ( $\pm$ EP) e altura ( $\pm$ EP) do tórax de rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015. ....	55
Tabela 6 - Comprimento total ( $\pm$ EP) do corpo de rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.....	56
Tabela 7-Aceitação das realeiras de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes os de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015. ....	72
Tabela 8 - Datas das realizações das capturas de imagens da área de cria das rainhas de <i>Apis mellifera</i> efetuadas no Apiário Experimentasl da UNEPE. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015. ....	76
Tabela 9 - Médias dos tratamentos (Média $\pm$ DP) de rainhas de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.....	80

Tabela 10 - Altura ( $\mu\text{m}$ ) das vilosidades do mesêntero de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015. ....81

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mensurações das rainhas de *A. mellifera* à emergência. A: Balança analítica com rainha de *A. mellifera* para mensuração de peso à emergência. B: Paquímetro digital para mensuração do comprimento, altura e largura do Tórax, Asa e Abdome.....50
- Figura 2 - Vista Lateral da Glândula Hipofaringeana (em vermelho) de abelhas de *Apis mellifera*. Fonte: honeybee.drawing.org.....57
- Figura 3 - A: Glândula hipofaringeana com Tratamento Boveril (*B. bassiana*). B: Glândula Hipofaringeana com tratamento Extrato de romã (*P. granatum*).....57
- Figura 4 - A: Glândula Hipofaringeana com tratamento Água + Tween® Em B: Glândula Hipofaringeana com Água Destilada.....57
- Figura 5 - Retirada de rainhas de *Apis mellifera*. A: Quadro de realeia com as larvas. B: Estufa tipo BOD para a emergência das rainhas.de *Apis mellifera* .....73
- Figura 6 - Emergência das rainhas de *Apis mellifera*. A: Emergência da Rainha. B: Transferência de rainhas de *A. mellifera* para o apiário UNEPE em gaiolas plásticas próprias para o transporte.....74
- Figura 7 - Etapa de identificação das rainhas de *A. mellifera*. Os adesivos (A) foram colados no tórax (B) para identificação a campo. ....74
- Figura 8 – A e B: Preparo da tela graduada para mensuração da área de cria.....75
- Figura 9 - Quadro pronto para captura da imagem, com identificação do quadro....75
- Figura 10 - Representação esquemática de uma secção longitudinal de operária de scaptotrigona, 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) .....76

Figura 11 - Imagens da dissecação de Rainhas Virgens de *Apis mellifera*. A: utilizando pinças e alfinetes. B: Rainha dissecada.....76

Figura 12 - A: Mesêntero da rainha de *Apis mellifera* fixado em *Bouin*. B: Mesêntero da rainha de *Apis mellifera* pronto para ser armazenado.....77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Abelhas.....	16
2.1.1 Caracterização do gênero <i>Apis</i> .....	17
2.1.2 Organização Social das Abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	18
2.1.3 Qualidade da rainha .....	20
2.1.4 Colapso das colmeias .....	22
2.2 CONTROLE BIOLÓGICO .....	23
2.2.1 O controle Biológico e a relação com a abelha <i>Apis mellifera</i> .....	26
2.2.2 Controle Biológico e a relação com outros organismos não-alvos da ordem Hymenoptera.....	27
2.3. EXTRATOS VEGETAIS .....	28
2.3.1 Extratos Vegetais e a relação com <i>Apis mellifera</i> .....	29
2.3.2. Extratos Vegetais e a relação com outros organismos não-alvos da ordem Hymenoptera.....	31
2.4 REFERÊNCIAS.....	33
<b>3 CAPÍTULO I - EFEITO DOS AGENTES DE CONTROLE SOBRE A MORFOMETRIA DE RAINHA DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)</b> .....	<b>42</b>
3.1 RESUMO.....	42
3.2 INTRODUÇÃO .....	44
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3.3.1 Obtenção do fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> .....	46
3.3.2 Obtenção do extrato vegetal de <i>Punica granatum</i> .....	46
3.3.3 Obtenção da <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	46
3.3.4 Agentes de controle sobre a morfometria de rainhas de <i>Apis mellifera</i> .....	48
3.3.5 Histologia das operárias amãs .....	49
3.3.6 Análises Estatísticas.....	51
3.4 RESULTADOS.....	51
3.4.1 Ação dos Agentes de Controle sobre a morfometria de rainhas de <i>Apis mellifera</i> .....	51

3.4.2 Histologia .....	55
3.5 DISCUSSÃO.....	57
3.6 CONCLUSÃO.....	61
3.7 REFERÊNCIAS .....	62
<b>4 CAPÍTULO II - QUALIDADE REPRODUTIVA DAS RAINHAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) SOB EFEITO INDIRETO DE AGENTES DE CONTROLE.....</b>	<b>66</b>
4.1 RESUMO.....	66
4.2 INTRODUÇÃO .....	68
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	70
4.3.1 Obtenção dos agentes de controle.....	70
4.3.2 Obtenção de <i>Apis mellifera</i> .....	71
4.3.3 Influência dos agentes de controle sobre a produção de cria de <i>Apis mellifera</i> .....	71
4.3.4 Histologia.....	76
4.3.5 Análises Estatísticas.....	78
4.4 RESULTADOS.....	79
4.4.1 Influência dos agentes de controle sobre a produção de cria de rainhas de <i>Apis mellifera</i> .....	79
4.4.2 Histologia.....	80
4.5 DISCUSSÃO.....	80
4.6 CONCLUSÃO.....	83
4.7 REFERÊNCIAS.....	84
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A maioria das espécies vegetais cultivadas no mundo é polinizada por insetos. E dentre os insetos conhecidos como polinizadores, destaca-se a abelha *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), responsável por 80% da polinização entomófila (McGREGOR, 1976; GALLO et al., 2002). As abelhas são os principais agentes polinizadores dos vegetais, e a polinização é considerada um fator de produção fundamental na condução de muitas culturas no mundo todo (SOUZA, 2007). As abelhas *A. mellifera* preferiram coletar pólen (63%) comparado ao néctar (37%) em estudo realizado com algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (MALERBO-SOUZA et al., 2011)

As abelhas são importantes organismos nas comunidades vegetais, garantindo maiores e melhores produções de frutos e grãos, pois são agentes polinizadores de diferentes espécies, contribuindo para o equilíbrio das populações de plantas e animais que vivem em ecossistemas naturais (JANZEN, 1980). Esta interação entre abelhas e plantas proporcionou aos vegetais uma importante adaptação evolutiva das plantas por meio da polinização cruzada, permitindo surgir novas combinações hereditárias, aumentar o vigor das espécies e aumentar a produção de grãos e frutos (COUTO & COUTO, 2002). As abelhas *A. mellifera* possuem a habilidade de visitar centenas de flores durante cada viagem ao campo para coletar pólen e néctar (FREE, 1993), além de serem as responsáveis pela produção de mel, cera, própolis, geleia real, pólen e apitoxina, produtos com vários efeitos benéficos para a saúde humana. As abelhas *A. mellifera* ao visitarem as flores de cebola, *Allium cepa* L. (Alliaceae) tocam as anteras e os estigmas e as operárias coletam o néctar, enquanto o pólen é obtido indiretamente enquanto se deslocam entre as flores (WITTER et al., 2003).

O Brasil, com o seu território continental, possibilita uma flora altamente diversificada e ampla variabilidade climática, possuindo um grande potencial apícola, tendo possibilidade de produzir mel o ano todo. O mel brasileiro possui variação de



cor, que está relacionada com a origem floral, amplamente diversificada (MARCHINI, 2001). O Paraná obteve a produção de 4.831 toneladas em 2009 segundo dados do SEBRAE (2011), e de 5.496 toneladas em 2012 segundo dados IBGE (2012), processo realizado por apicultores com níveis tecnológicos diversos, entre eles agricultores familiares, de base ecológica. Nestas propriedades, a criação de abelhas aparece como atividade indispensável nos sistemas de produção, devido a sua importância ecológica com a polinização dos cultivos, e econômica como produção de mel, pólen e própolis e geração de novas fontes de renda (WOLFF, 2007).

Pode haver redução na produção de culturas pela perda dos polinizadores, devido aos inseticidas utilizados, doenças ou insetos parasitas que podem afetar ou diminuir sua população (KEVAN, 1999). Esses polinizadores também podem ser utilizados como bioindicadores, monitorando o estresse ambiental, já que ao explorar a área que cerca o seu habitat, diversos micro-organismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptadas e ficam aderidas ao corpo ou são ingeridas pelas abelhas polinizadoras (MIOTTO, 2012).

Accorti et al.(1991) também relatam que as abelhas *A. mellifera* podem ser utilizadas como bioindicadores, mas limita seu uso, devido a alguns aspectos que dificultam sua avaliação, como a excessiva sensibilidade aos produtos químicos, que provocam sua morte a campo. Porém, mesmo utilizando produtos fitossanitários naturais e/ou agentes de controle biológicos, estes podem apresentar efeitos de repelência e mortalidade sobre as abelhas.

Produtos naturais foram testados sobre *A. mellifera* e observado que extratos a base de rotenona, *Derris* sp. (Leguminosae) provocam mortalidade de 37% sobre operárias adultas; andiroba, *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) causa mortalidade em 20%; extrato de alho, *Allium sativum* (Liliaceae) provoca mortalidade em 62%; óleo de nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae) provoca mortalidade em 85%; citronela, *Cymbopogon* spp. (Poaceae) e eucalipto *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae) ambos com potencial de 50% de mortalidade sobre as operárias adultas (XAVIER, 2009).

Quanto aos produtos biológicos, Conceição (2014) ao testar a suscetibilidade de abelhas operárias *Melipona scutellaris* Latreille, 1811: (Bals) (Hymenoptera Apidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.), em diferentes concentrações, concluiu que as abelhas operárias foram afetadas, perdendo a mobilidade e atingiram o índice de mortalidade de 56%.

Estes agentes de controle são utilizados para o controle de insetos, sendo que muitos estudos foram realizados para verificar a eficácia contra diversas ordens e espécies. No entanto, existem poucos trabalhos sobre o que estes provocam nos organismos não-alvos, em especial na rainhas de *A.mellifera*.

Devido a isto, se verificou a necessidade de estudar o quanto estes agentes de controle poderiam interferir no desenvolvimento e na qualidade da rainha, analisando os efeitos sobre este indivíduo e sobre sua cria. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar efeito de agentes de controle sobre a qualidade de rainhas de *A. mellifera* africanizadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ABELHAS

As abelhas apresentam importância para a manutenção da vida no planeta, sendo responsáveis pela polinização de ecossistemas agrícolas e naturais, bem como a produção de diversas substâncias úteis aos homens.

Os polinizadores fornecem um serviço essencial ao ecossistema e trazem inúmeros benefícios à sociedade, por meio do seu papel na produção de alimento e da agricultura, além de melhorias nos meios de subsistência através dos produtos gerados, desenvolvimento científico e na conservação da diversidade biológica. A interação entre as abelhas e as plantas garantiu o sucesso da polinização cruzada, importante adaptação evolutiva que proporcionou aumento do vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e aumentando a produção de frutos e sementes (SOUZA, 2007). A grande maioria de espécies de plantas necessita de animais, como aves, mamíferos e insetos para que ocorra a polinização.

Aproximadamente 73% das plantas com flores dependem de alguma espécie de abelha para a polinização, e esses animais dependem diretamente da coleta de pólen e néctar para alimentar suas larvas e adultos (VIANNA & SILVA, 2006). O pólen das plantas é um recurso oferecido de uma só vez, ao contrário do néctar, oferecido ao longo do dia. O pólen é a principal fonte de proteína para a maioria das abelhas e é utilizado para o desenvolvimento da cria (KLEINEART et al., 2009). Ao testar a concentração de açúcares em *Citrus sinensis* L. Osbeck, foi verificado que a alta concentração de açúcares serve como atrativo a *A. mellifera*, e a disponibilidade do néctar concentrado ao longo do dia atrai os polinizadores (MALERBO-SOUZA et al., 2003).

Ao buscar sua alimentação nas flores, as abelhas que alimentam suas larvas com néctar e pólen, levam-no para outras flores, tornando possível a reprodução das mais variadas plantas. O pólen coletado nos pêlos do corpo é agrupado pelas

pernas por meio de escovas de coleta de pólen e uma corbícula em cada perna posterior, sendo depois transferido para as peças bucais (GULLAN & CRANSTON 2009). Todas as abelhas da família *Apidae* são caracterizadas pela presença da corbícula, ou cesta de pólen, na superfície externa de cada uma das tíbias das pernas traseiras, em especial nas operárias, e esta estrutura é usada para carregar pólen e materiais necessários para a construção do ninho (WINSTON, 2003).

### 2.1.1 Caracterização do gênero *Apis*

As abelhas pertencem a classe Insecta, Filo Arthropoda, da Ordem Hymenoptera, da qual as vespas e formigas também fazem parte. As abelhas formam uma superfamília chamada de Apoidea, família *Apidae* (GULLAN & CRANSTON, 2009).

As abelhas da família *Apidae* são classificadas num único gênero *Apis*, que inclui cinco espécies: a abelha comum (*A. mellifera*), a abelha gigante (*Apis dorsata* e *Apis laboriosa*), a abelha índia (*Apis cerana*) e a abelha anã (*Apis florea*) (WINSTON, 2003).

O corpo de uma abelha possui três partes: a cabeça, o tórax e o abdome. A maioria das funções da cabeça está ligada à ingestão e digestão parcial do alimento através das partes bucais e glândulas associadas, como as glândulas hipofaríngeas, com a função de produção da geleia real. A cabeça é, também, a região mais sensível do corpo através dos olhos, antenas e pêlos sensíveis. O tórax é composto de três segmentos, cada um com um par de pernas; além disso, cada um dos dois segmentos torácicos posteriores suportam um par de asas. O abdome consiste de sete segmentos visíveis e contém todos os órgãos internos, como o sistema digestório, e também uma estrutura terminal, o ferrão (GALLO et al., 2002; WINSTON, 2003).

O canal alimentar dos insetos é dividido em três regiões: estomodeu ou intestino anterior; proctodeu ou intestino posterior e mesêntero ou intestino médio (ventrículo). O ventrículo é a região do tubo digestório onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos da digestão, sendo, portanto,

considerado o estômago funcional dos insetos. É um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco, no interior da cavidade abdominal. A sua parede é constituída pelo epitélio e por fibras musculares viscerais (CRUZ-LANDIM, 2009).

As células desta região apresentam, em geral, invaginações da membrana basal que contribuem no aumento da superfície de troca seletiva com a hemolinfa, e microvilosidades, as quais são responsáveis pelo aumento da superfície de absorção celular. São constantemente renovadas devido ao desgaste causado pela intensa atividade secretora e absorptiva e, às vezes, pela atividade excretora ou por fatores genéticos de envelhecimento celular, podendo também ser alterados quando há absorção de produtos químicos, como inseticidas. Estas células principais têm por função a produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos que ocorre na luz do ventrículo, além de absorverem produtos da hemolinfa que tem por finalidade, serem excretados (CRUZ-LANDIM, 2009).

A glândula hipofaríngeana é responsável pela produção de alimento para as larvas e para a rainha de *A. mellifera* (SIMÕES et al., 2010). A secreção produzida por estas glândulas representa um importante componente do processo de diferenciação de castas em abelhas, onde, na fase larval, apenas indivíduos que se tornarão rainhas recebem continuamente este alimento, chamado geleia real (CRUZ-LANDIM, 2009).

### 2.1.2 Organização Social das Abelhas *Apis mellifera*

Uma colmeia de abelhas *A. mellifera* é formada por três tipos de indivíduos: zangões, rainha e operárias, os quais exercem papéis distintos nessa sociedade (WINSTON, 2003). Estes insetos sociais apresentam uma divisão de trabalho em suas colônias, que envolve o zangão na função de reprodução, a rainha, genitora de todos os integrantes da colônia, e as operárias, que se diferem por serem menores, possuírem glândulas de cera e apresentarem um aparato para coleta de pólen, que compreende em escovas e uma corbícula em cada perna posterior e por terem um ferrão com farpas, que não pode ser retraído após o uso (GULLAN & CRANSTON, 2009). Na rainha, as farpas do ferrão são menos desenvolvidas que nas operárias e

a musculatura ligada ao ferrão é bem forte para que a rainha não o perca após utilizá-lo, sendo o ferrão um instrumento de orientação, que visa localizar as células dos favos onde irá ovular ou então utilizado para defesa (RAMOS & CARVALHO, 2007).

Os zangões, que se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, executam a função de fecundar a rainha (WINSTON, 2003). São produzidos durante toda a vida da colônia pela rainha, mas contribuem pouco, vivendo somente para se acasalar, tendo sua genitália arrancada depois da cópula e morrendo em seguida (GULLAN & CRANSTON, 2012). A fecundação da rainha acontece durante o vôo nupcial, que são realizados por rainhas com cinco a sete dias de vida, que atraem zangões de uma distância de até cinco quilômetros (COUTO, 2006).

Dos ovos fertilizados, se desenvolvem rainha ou operárias, e formam duas castas distintas. A composição do alimento fornecido às larvas é o que determina se um ovo fertilizado vai se desenvolver em uma operária ou rainha. As larvas de até três dias podem diferenciar-se em rainhas ou operárias em função da alimentação, assim a quantidade e qualidade do alimento agem sobre o sistema hormonal da larva, determinando a sua casta (WINSTON, 2003), além disto estas duas castas também se desenvolvem em células diferentes e são alimentadas num processo de alimentação conhecido como progressivo, em virtude do fato das abelhas nutrizas depositarem o alimento larval nas células, durante visitas periódicas (RAMOS & CARVALHO, 2007). Este alimento da rainha é chamado de geleia real e difere do alimento das operárias pela quantidade fornecida e por conter alto teor de açúcar e ser composto predominantemente por produtos da glândula mandibular, ou seja, ácido pantotênico e bipterina (GULLAN & CRANSTON, 2009).

A rainha inicia a postura após o terceiro dia de sua fecundação, depositando um ovo em cada alvéolo. O ovo é cilíndrico, de cor branca e, quando recém colocado, fica em posição vertical no fundo do alvéolo (RAMOS & CARVALHO, 2007). A rainha, além de ser a única fêmea apta a fecundar, mantém a unidade e a organização social da colônia através de feromônios que são por ela produzidos (PEREIRA, 2008). Com este controle através dos feromônios sobre a colônia, a

rainha também consegue influenciar na fisiologia das operárias, fazendo com que permaneçam estéreis (WINSTON, 2003), controlando a reprodução das operárias, inibindo de modo efetivo o desenvolvimento do ovário das operárias (GULLAN & CRANSTON, 2009).

As operárias jovens tendem a ser abelhas-de-colmeias, engajadas em atividades dentro das colmeias, tais como cuidar das larvas e limpar células, e as operárias mais velhas são abelhas-de-campo, para forrageamento (GULLAN & CRANSTON, 2009). A partir do 21º dia, são chamadas de campeiras e trabalham buscando néctar e polen, até o final de suas vidas, que dura, em média, de 38 a 42 dias. Estes períodos de atividades em relação à idade são flexíveis e podem variar de acordo com a demanda da colmeia (ROCHA, 2008)

### 2.1.3 Qualidade da rainha

Em uma colmeia de *A. mellifera* existe apenas uma rainha que é a fêmea produtiva, capaz de colocar até dois mil ovos por dia em época de abundância de alimento, e é a responsável pela manutenção populacional das abelhas dentro da colmeia (ITAGIBA, 1997). As rainhas mantêm o controle sobre a reprodução das operárias principalmente por meio de feromônios. As glândulas mandibulares das rainhas produzem um composto identificado como ácido (E)-9-oxodec-2-enóico (9-ODA), mas a rainha intacta inibe o desenvolvimento ovariano das operárias de forma mais efetiva do que esse composto ativo (GULLAN, 2007).

A contribuição da rainha no desenvolvimento da colmeia pode ser definida pela qualidade e quantidade de ovos que estas ovipositam, bem como dos feromônios que a rainha libera, sendo a responsável pela homeostase dentro da colônia (BIENEFELD & PIRCHNER, 1990). Na organização social das abelhas é importante a manutenção da homeostase, controlando variáveis como a umidade relativa e a temperatura dentro da colônia. Este controle é importante para a incubação da cria em condições controladas e sobrevivência de colônias populosas durante invernos frios (LOLI, 2008). Desta forma, a homeostasia dentro da colônia

resultando no perfeito funcionamento de uma colônia é considerada uma vantagem dos insetos com organização social (WINSTON, 2003).

A qualidade de uma rainha é determinada por fatores intimamente relacionados à sua capacidade reprodutiva como a atividade de oviposição, a qualidade da cria gerada, refletidos no peso destas e a sua longevidade (DE SOUZA, 2009). Segundo Winston (2003), o peso da rainha ao emergir pode ser considerado um possível indicador da qualidade reprodutiva e da longevidade da rainha, portanto, neste caso o peso estaria relacionado ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas. Também Hatjina et al. (2014) descreveu algumas características físicas que determinam a qualidade de uma rainha como peso vivo; elevado número de ovariolos; tamanho da espermateca; elevado número de espermatozoides armazenados e estar livre de doenças e pragas.

A qualidade de uma rainha não é nem um único atributo nem mesmo um grupo de atributos. É um resultado coletivo de vários grupos de atributos tais como: fisiológicos e biológicos que foram influenciados pelo processo de reprodução (tamanho do corpo e comprimento de asa, peso, número de ovariolos, diâmetro de espermateca); atributos fisiológicos e biológicos que foram influenciados pelo processo de fertilização (número de espermatozoides na espermateca, tempo do início da oviposição, variabilidade genética do esperma) e os atributos de comportamento/desempenho da rainha que refletem os traços herdados por ambos, a rainha e o zangão com quem se acasalaram, mas também foram influenciados pelas condições ambientais (produção de mel, desenvolvimento da colônia, agressividade, comportamento higiênico e prevalência de doenças). Portanto os métodos para avaliação da qualidade de rainha podem ser através de características físicas e do desempenho da colônia (HATJINA, 2014).

Aspectos importantes da biologia da abelha são a relação entre a forma e função, como a forma e o tamanho da cesta de pólen tem correlação com a produção de mel da colmeia, o comprimento e largura da asa está diretamente relacionada com a capacidade de vôo da abelha e a maior ou menor entrada de



néctar na colméia tem haver com o comprimento da probóscide e o tipo de corola da flor visitada pela abelha (SOUZA et al., 2009)

#### 2.1.4 Colapso das colmeias

A apicultura americana foi alarmada sobre a Desordem do Colapso das colônias CCD (*Colony collapse disorder*), no final de 2006, onde milhares de colmeias foram dizimadas e o principal prejuízo foram perdas consideráveis para a agricultura em função da falta de polinizadores (COSTA-MAIA et al., 2010).

Segundo VanEngelsdorpet al. (2007 e 2009), CCD é qualificado pela rápida perda da população de abelhas adultas; poucas ou nenhuma abelha adulta morta dentro ou fora da colônia; excesso de populações de crias em relação a população de abelhas adultas, podendo ser observada a presença de rainha; ausência de evidências de traça da cera ou outras pragas como pequenos besouros e com freqüência ficam reservas de alimentos nas colmeias. Perdas anuais da ordem de 30% nos EUA foram verificadas em 2007, preocupando toda a cadeia apícola. Várias indicações do agente causador têm sido apontadas, como presença de pragas como o ácaro *Varroa* (Varroidae) ou outros pequenos besouros, e o uso de produtos químicos para controlá-los ou a falta de alimento para suprir as colmeias, mas ainda não pode ser confirmada com exatidão qual a causa.

No Brasil, o colapso das colmeias, foi observado pela primeira vez em duas colmeias na região de Altinópolis, SP, em agosto de 2008 (com intervalo de 14 dias), deixando muito alimento (mel/pólen), poucas crias e abelhas adultas, presença da rainha, ausência de abelhas adultas mortas e de crias doentes. Em abril de 2010, entre duas coletas de abelhas forrageiras (com intervalo de três dias) em um apiário experimental com 20 colmeias no campus da USP de Ribeirão Preto, SP, observaram-se a perda de duas colônias com sinais clínicos similares aos da CCD (MESSAGE, 2012).

Novos estudos necessitam ser realizados para determinar o papel de diferentes viroses, do ácaro *Varroa destructor*, do microsporídeo *Nosema ceranae* e

de inseticidas fipronil e neonicotinóides que são intensamente utilizados como inseticidas sistêmicos (DE JONG, 2013).

Dentre as prováveis causas para o desaparecimento das abelhas, a utilização de produtos químicos tem destaque por ser uma prática amplamente utilizável no meio agrícola, sendo utilizadas em todas as culturas, épocas do ano e formas de aplicação possível. Produtos químicos, principalmente os inseticidas, podem ser tóxicos aos polinizadores, causando vários distúrbios comportamentais (NRCS, 2008). E, conforme Gallo et al. (2002), muitos inseticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser tóxicos para as abelhas. Sendo assim, utilizar práticas agrícolas com menor impacto ao ambiente, preservando todos os animais benéficos para o ecossistema, como os polinizadores e inimigos naturais, é prudente e necessário para não prejudicar toda a cadeia agrícola.

A redução dos polinizadores provoca a falta ou redução de polinização ou seja, limitação do rendimento das culturas por meio de polinização incompleta, podendo restringir o rendimento de culturas altamente dependentes de polinizadores até na ausência de qualquer crise da polinização (AIZEN et al., 2009)

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na utilização racional de agentes entomopatogênicos, visando à manutenção da população das pragas a níveis não econômicos. Este tipo de controle poderá fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir a população dos insetos pragas a níveis de dano não-econômicos (ALVES, 1998). Este se constitui em um processo para atender a demanda, cada vez maior, de produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações convencionais de agrotóxicos. O conhecimento sobre micro-organismos como agentes de controle de pragas e doenças de plantas remonta a centenas de anos (ALVES, 2008).

O controle biológico é uma ferramenta que pode ser utilizada no manejo integrado de pragas, pois protege a biodiversidade, possui especificidade não

causando desequilíbrio no ambiente, não deixa resíduos, não afeta os polinizadores e pode ter bom custo/benefício (BARRERA, 2007).

Os chineses, a 2700 a.C. e os egípcios a 2200 a.C., foram os primeiros a relatar sobre doenças apresentadas pelas abelhas e pelo bicho-da-seda. Os ensinamentos básicos da patologia de insetos foram elaborados entre os séculos XVIII e XIX e ministrados por grandes cientistas como Agostino Bassi, Louis Pasteur e Réaumur. Nessa mesma época ocorreram também as primeiras aplicações de vírus e fungos para o controle de insetos (ALVES, 1998). Os primeiros bioinseticidas surgiram na década de 1950 e poucos anos mais tarde já existiam vários produtos comerciais com distintos micro-organismos e importantes programas de controle de pragas implantados no país, vinculados ao governo federal e órgãos estaduais (ALVES et al., 2008).

O uso de agentes de biocontrole encontra-se bem difundido em diversos países, mas ainda é uma estratégia em crescimento na América Latina (ALVES et al., 2008b). Uma das razões para tal fato, além de aspectos socioculturais, está relacionada à pequena quantidade de produtos disponíveis no mercado nacional. A produção massal de agentes de controle de pragas e doenças, viabilizando o fornecimento de grandes quantidades de micro-organismo, é imprescindível para o crescimento desse método de controle no país. Muitos programas de controle biológico com micro-organismos utilizam a estratégia de inundação, na qual o agente de controle deve estar disponível em grandes quantidades (BUENO, 2003).

Entre os agentes causais de doenças infecciosas em insetos, os fungos são patógenos de largo espectros, capazes de colonizar diversas espécies de insetos e ácaros e de causar, com frequência, epizootias em condições naturais (ALVES, 2008). A eficiência dos fungos depende de fatores bióticos, relacionados ao hospedeiro e patogénos, e abióticos, tais como a umidade relativa do ambiente a qual pode controlar o desenvolvimento do processo infectivo (ALVES, 1998).

Segundo Alves (1998) *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. é um patógeno considerado geralmente invisível ao sistema de defesa, conseguindo colonizar os insetos quando os seus conídios e micélio são inoculados na hemolinfa, assim os

insetos infectados podem apresentar reação de defesas diversas, como fagocitose, nodulação, encapsulação e coagulação.

O fungo *B. bassiana* causa a doença denominada doença branca nos insetos, após a penetração e desenvolvimento dentro do hospedeiro. Quando os esporos desse fungo entram em contato com a cutícula de insetos suscetíveis eles germinam e desenvolvem diretamente da cutícula para o interior do corpo de seu hospedeiro. Nesse local o fungo prolifera se espalhando totalmente, produzindo toxinas e drenando os nutrientes até provocar a morte do hospedeiro (ALVES, 1998b).

A utilização de entomopatógenos tem como vantagem: especificidade, sendo que mesmo quando aplicado em grandes quantidades são considerados inócuos aos organismos não alvos. A dispersão natural dos patógenos possibilita a transmissão e a redução natural da praga, ou seja, além da mortalidade direta, podem afetar gerações futuras, diminuindo a ovoposição e a viabilidade dos ovos, portanto o controle é mais duradouro, fazendo com que a doença assumo caráter enzoótico, mantendo a população da praga em níveis baixos, além de não poluírem o ambiente (ALVES, 1998a).

Como desvantagem do uso de entomopatógenos há a especificidade, não permitindo que o inimigo natural tenha um largo espectro de ação sobre diferentes pragas ao mesmo tempo; determinados patógenos necessitam de condições climáticas favoráveis; possuem ação mais lenta; exigem maiores cuidados no armazenamento; exige um grau de conhecimento de tecnologia para ser eficiente sua aplicação (ALVES, 1998a).

Os micro-organismos entomopatogênicos têm sido utilizados no Brasil, mas têm despertado interesse e preocupação sobre os possíveis efeitos diretos e indiretos que podem ocasionar em diferentes espécies, como os organismos não-alvos, pois afetam todos os organismos relacionados a uma determinada praga e que ocupam o mesmo habitat (SOSA-GÓMEZ et al., 1998).

### 2.2.1 O controle Biológico e a relação com a abelha *Apis mellifera*

Um exemplo da necessidade de utilizar o controle biológico é para evitar o aparecimento da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). A intensidade dos prejuízos provocados pela traça da cera e os riscos de utilizar produtos químicos nas colmeias e nos favos armazenados, levaram a busca de alternativas para conseguir o controle adequado da traça sem prejudicar as abelhas e não contaminar o mel e demais produtos apícolas. O método sugerido é o térmico, considerado de alto custo e de pouca eficiência (BOLLHALDER, 1999). O produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915), Dipel® 32 PM, pode ser empregado no controle da traça da cera *G.mellonella*, mas não está registrado para proteção de favos (DIAS, 2001). Já Brighenti (2002) testou vários métodos de aplicação do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915), por pulverização, imersão dos favos e incorporada à dieta artificial fornecida às lagartas. O método de imersão dos favos atingiu média superior a 80% de mortalidade das lagartas em todas as doses utilizadas.

Foram testados tipos de aplicação para a conservação de favos, em que a incorporação de *B. thuringiensis*, utilizando a dose comercial recomendada, foi pulverizada sobre os quadros indicando a termonebulização como a mais satisfatória, permitindo o controle da traça da cera na entressafra (VANDENBERG & SHIMANUKI, 1990a).

Em testes realizados com *B.thuringiensis* mergulhando pedaços de favos na formulação comercial e depois colocando estes favos junto a lagartas de *G. mellonella* entre o 3º e 5º instar, mostraram que as maiores dosagens testadas, 8,34 g/L e 12,50 g/L, causaram mortalidade sobre a traça-da-cera, seis dias após pulverização. Este mesmo produto, quando pulverizado sobre larvas de *A. mellifera* africanizadas e sobre seu alimento líquido dentro dos alvéolos, nas concentrações entre 4,16 e 12,50 g/l, causaram mortalidade significativa das abelhas, avaliadas seis dias após a pulverização (WOLFF, 2009).

Foi testado o fungo *B. bassiana* para o controle de *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), praga importante na cultura da canola, (*Brassica napus* L.) na

forma de vetorização da abelha *A. mellifera*. Foram testados três isolados do *B. bassiana*, ARSEF 3769, BB008 e GHA, apresentando controle sobre o *Lygus lineolaris* e não demonstrando nenhum efeito prejudicial para as abelhas (AL MAZRA'AWI et al., (2006).

Três isolados de *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana* e *Clonostachys rosea* foram testados para controle do ácaro, *V.destructor*. A metodologia foi inocular os ácaros com os fungos e introduzi-los no interior da colmeia. Após sete dias da inoculação, os três fungos causaram mortalidade significativa no ácaro, mas também causaram danos a *A. mellifera*. *M. anisopliae* provocou alta mortalidade do ácaro (90%) e baixa mortalidade nas abelhas (24%) enquanto o *B. bassiana* também provocou mortalidade próximo a 90% mas com mortalidade nas abelhas de 59% (HAMIDUZZAMAN et al., 2012).

### 2.2.2 Controle Biológico e a relação com outros organismos não-alvos da ordem Hymenoptera

Conceição (2014) testou a suscetibilidade de abelhas operárias *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Bals) (Hymenoptera Apidae) a *B. bassiana* em diferentes concentrações,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, aplicados diretamente no tórax das abelhas e indiretamente (aplicado 1mL do fungo em folhas de papel filtro com exposição das abelhas por cinco minutos). Não houve efeito dos métodos de exposição sobre a mortalidade de abelhas *M. scutellaris*, mas foi verificado que mesmo nas menores doses, houve redução de mobilidade das abelhas operárias.

Os fungos *B. bassiana* Esalq 447 e *M. anisopliae* E9 foram testados na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL sobre o parasitóide *Oomyzus sokolowskii*. Para isto, houve exposição das larvas de *Plutella xylostella*, traça-das-crucíferas, ao parasitóide e 24h depois, a pulverização com os fungos entomopatogênicos. Verificou-se que a eficiência de *O. sokolowskii* foi influenciada negativamente pela presença dos fungos, reduzindo o parasitismo (SANTOS JR. 2006).

*B. bassiana* (isolado Unioeste 1) e *M. anisopliae* (isolado Unioeste 22) na concentração de  $1,0 \times 10^9$  conídios/mL pulverizados sobre os ovos de *Anagasta*

*kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) não provocaram repelência ao parasitismo de *Trichogramma pretiosum* R. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (POTRICH et al., 2009).

*B. bassiana* (Bals.) e *M. anisopliae* (Metsch.) não têm efeito negativo sobre os parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* quando pulverizados sobre ovos do hospedeiro *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) o que possibilita o uso integrado desses agentes de controle biológico em programas de manejo integrado de pragas (POLANCZYK, 2010).

### 2.3. EXTRATOS VEGETAIS

As substâncias químicas provenientes de plantas são utilizadas com o objetivo de reduzir o crescimento populacional de insetos pragas, utilizadas em concentrações variadas podem provocar diversos níveis de danos aos insetos, até a sua morte (GALLO et al., 2002).

Muitas plantas têm sido estudadas para avaliação de atividades inseticidas. A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários, que podem possuir atividades sobre os insetos, tais como os alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, óleos essenciais, saponinas, heterosídeos cardioativos (CARDOSO et al., 2001).

Para que seja considerado comercialmente viável, um inseticida natural deve preencher alguns requisitos como: seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade (CORRÊA, 2007), problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aparecimento de insetos resistentes (GALLO et al., 2002).

A seletividade é uma das principais características para escolha do produto a ser aplicado, preservando os insetos benéficos e controlando os insetos pragas, sendo a ausência dessa característica uma das limitações de sua utilização no campo (XAVIER, 2009).

Ao utilizar produtos vegetais com atividade inseticida, pode-se observar os seguintes efeitos sobre os insetos: repelência, inibição da oviposição, inibição da alimentação, inibição de crescimento, alterações do sistema hormonal, alterações morfológicas, alterações no comportamento sexual, esterilização dos adultos, mortalidade na fase imatura ou adulta. Portanto a mortalidade nem sempre é o objetivo final, considerando que para isto geralmente são necessárias concentrações elevadas do produto (GALLO et al., 2002)

*Punica granatum* Linn. é um arbusto pequeno, da família Punicáceas, nativo das regiões mediterrâneas, mundialmente cultivado nas regiões tropicais e subtropicais. A planta é conhecida popularmente como Romã sendo largamente utilizada na medicina popular (LORENZI, 2001).

### 2.3.1 Extratos Vegetais e a relação com *Apis mellifera*

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

O macerado floral de camará (*Lantana camara*) em operárias de *A. mellifera*, quando administrado em concentrações iguais ou superiores a 7,5% provocou diminuição na sobrevivência das mesmas. Mas quando o macerado foi oferecido em concentração igual ou inferior a 5,0% a sobrevivência das operárias não foi afetada (PEREIRA, 2005).

Conforme Singaravelan (2006), a ação de *Nicotiana* spp. (Solanaceae), fornecido como alimento às operárias adultas e larvas de *A. mellifera*, na concentração de 50 ppm, causou 70% de mortalidade.

Silva et al. (2007), em estudos realizados em laboratório com *A. mellifera*, acondicionadas em frascos de vidro (8 abelhas por frasco) e em contato com um



papel filtro embebido em óleos de mamona (*Ricinus communis* L.), de neem (*Azadirachta indica*) e de soja (*Glycine max*) ( 2L/100L), verificaram que esses produtos não afetaram a longevidade das operárias, após 72 horas de exposição.

O produto Rotenat<sup>®</sup> CE, (1 mL/200 mL), causou mortalidade em 33% das operárias de *A. mellifera*, após quatro dias de exposição por contato, enquanto o produto Natuneem (0,2 mL/100 mL), nestas mesmas condições, ocasionou 80% de mortalidade e o produto Natualho<sup>®</sup>(30 mL/100L) provocou 55% de mortalidade (XAVIER, 2009).

Natuneem<sup>®</sup> (500 mL/100L) e Pironat<sup>®</sup> (250mL/100L), aplicados por via de contato (nas concentrações 0,25×, 0,5×, 1× e 2× a dose recomendada) sobre operárias de *A. mellifera* não provocaram efeito tóxico e não interferiram na longevidade das abelhas (EFROM, 2009)

Ao testar diferentes composições de alimentos com água, mel, pólen apícola, flores de neem e cheiro das flores de neem, para operárias de *A. mellifera* criadas em laboratório, o tratamento água e flores de neem foi o que provocou 100% de mortalidade nos quatro dias iniciais do experimento (ALVES, 2010).

Testes com produtos a base de neem, organic Neem (1,7 g i.a/L) e Azamax (12g i.a./L) foram realizados, incorporando estes produtos à dieta de *A. mellifera* por três dias e em seguida avaliadas por 16 dias, e não apresentaram efeito tóxico sobre operárias de *A. mellifera* (Amaral, 2011).

No trabalho desenvolvido por Vilani (2013), extratos de pimenta dedo de moça *Capsicum baccatum* (Solanaceae), pitanga *Eugenia uniflora* (Mirtaceae), trombeta *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) e uva do Japão *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae) foram testados sobre operárias de *A. mellifera*. Esta autora verificou que o extrato de uva do Japão foi tóxico aos adultos de *A. mellifera*, reduzindo a longevidade em 54,20 horas, quando pulverizado sobre as abelhas. No entanto, os demais extratos não foram tóxicos, nem quando adicionados à pasta Candi.

Extratos vegetais de manjerona (*Origanum majorana* L.), chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*), romã (*Punica granatum*) e camomila (*Matricaria recutita* L.) quando incorporados na dieta de *A. mellifera* e/ou quando pulverizados sobre

uma superfície, causaram redução na sobrevivência das operárias. Os extratos de manjerona e romã causaram modificações morfológicas no mesêntero de *A. mellifera*, reduzindo o comprimento das células (SILVA, 2014).

As abelhas *A. mellifera* apresentam extrema importância para a manutenção da biodiversidade vegetal e mesmo assim são encontrados poucos trabalhos e pesquisas que remetem à ação dos extratos vegetais sobre estas e, em particular, sobre as rainhas de *A. mellifera*.

### 2.3.2. Extratos Vegetais e a relação com outros organismos não-alvos da ordem Hymenoptera

Ovos de *A. kuehniella* parasitados por *T. pretiosum* foram imersos em extrato de folhas de *Trichilia pallida* Swartz e extrato aquoso de sementes de *A. indica*, ambos na concentração de 10% (p/v) O neem provocou efeito repelente sobre as fêmeas do parasitoide, reduzindo de forma significativa o parasitismo, além de reduzir a emergência dos adultos, afetando todas as fases de desenvolvimento deste (GONÇALVES-GERVÁSIO et al., 2004).

Thuler et al.(2008) testou a interação do inseticida químico, variedades de brássicas e extrato vegetal de óleo de neem a 0,16% e extrato pirolenhoso a 3,0% em ovos da lagarta *Plutella xylostella* ao parasitismo do *Trichogramma*. Para cada parasitoide *T. pretiosum* e *T. exiguum* foram oferecidos ovos de *P. xylostella*, onde lagartas foram alimentadas com folhas tratadas, por 24 horas e em seguida foram avaliados, observando que esta interação entre cultivares e os produtos foi prejudicial à atuação do *Trichogramma*, diminuindo o número de ovos parasitados e a porcentagem de emergência dos parasitóides.

Natuneem®, um produto a base de óleo de neem, na dose de 50mL/100L em teste com e sem chance de escolha, foi considerado seletivo ao parasitoide de ovos *Telenomus podisi* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae) por não interferir nos parâmetros biológicos avaliados, não repelindo o parasitismo (SMANIOTTO, 2013).

Bernardes et al. (2014), testou a aplicação com neem em duas concentrações 30 mg (i.a/L) (dose recomendada) e 60 mg (i.a/L) em *Melipona quadrifasciata* e

*Partamona helleri*, pela entrada e caminhar em áreas tratadas e não tratadas, por 10 min, e através da dieta contaminada com neem. O neem não repeliu, não causou irritabilidade, nem fagoinibição em nenhuma das espécies de abelhas. Porém, *M. quadrifasciata* apresentou irritabilidade na concentração de 60mg i.a./L, pois permaneceu menos tempo na área da arena tratada, demonstrando que o uso de neem, em concentrações recomendadas, não altera a polinização de culturas visitadas por *P. helleri* e *M. quadrifasciata*, porém pode expor as forrageiras e as colônias dessas abelhas à contaminação.

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

## 2.4 REFERÊNCIAS

ACCORTI, M., GUARCINI, R., PERSANO, L. The bee as a biological indicator and test insect. **Ethology Ecology&Evolution**. V.3 1991.

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current biology**, v. 19, n. 11, p. 915-918, 2009.

AL MAZRA'AWI, M. S., SHIPP, J. L., BROADBENT, A. B., & KEVAN, P. G.; Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. **Environmental entomology**, v. 35, n. 6, p. 1569-1577, 2006.

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

ALVES, S. B.; PEREIRA, R.M.; Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: **FEALQ**, 1163p. 1998.

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

ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens. p.21-37. In S.B. Alves (ed.) Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, **FEALQ**, 1163p. 1998a.

ALVES, S. B.; Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.) Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: **FEALQ**, 1163p. 1998b.

ALVES, S. B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: **FEALQ**, 414p. 2008.

AMARAL, R.L. Efeito de formulações de nim na sobrevivência de operárias de *Apis mellifera*. Viçosa, MG 21 F, **Dissertação (mestrado)** 2011.

BARRERA, J.F. Introducción, filosofía y alcance del control biológico, pp. 1-18 In: Teoría y Aplicación del Control biológico. **Sociedad Mexicana de Control biológico**, México, 303p. 2007.

BERNARDES R.C.; TOME H.V.V.; ARAUJO M.F.; CRUZ F. M.;LIMA M.A.P.; Inseticidas derivados do nim causam repelência, irritabilidade ou fagoinibição em abelhas sem ferrão? **Congresso Brasileira de Entomologia**, Anais...Goiânia. 2014.

BIENEFELD, K. &PIRCHENER, F. Heritabilities for several colony traits in the honeybee (*Apis mellifera carnica*). **Apidologie** 38, 77-85 1990.

BOLLHALDER, F. *Trichogramma* for wax moth control. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 139, n. 9, p. 711-712, 1999.

BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; GUIMARÃES, C. R.; CARVALHO, S. M. Longevidade de adultos *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) pulverizados com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915). In: **CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 11. Lavras. Anais... Lavras: UFLA, CD-ROM. 2002.

BUENO, V.H.P.; LINS JR., J.C.; MOINO JR., A.; SILVEIRA, L.C.P.; Controle Biológico e manejo de Pragas na Agricultura Sustentável. Departamento de Entomologia – **UFLA** 52p. 2003.

CARDOSO, M. DAS G.; SHAN, A.Y.K.V.&SOUZA, J.A. DE. Fitoquímica e química de produtos naturais. Textos acadêmicos. Lavras –MG: **UFLA/FAEPE**. 67p. 2001.

CONCEIÇÃO D. J., P. et al.,;Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. **Sociobiology**, v. 61, n. 2, p. 184-188, 2014.

CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; Produtos Naturais no Controle de Insetos. **EdUFSCar**. São Carlos-SP. 150 p. 2007.

COSTA-MAIA, F. M., Lourenço, D. A. L., & Toledo, V. A. A.; Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. **Sistemas de Produção Agropecuária** (Ciências Agrárias, Animais e Florestais), 45-67. 2010.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos. **FUNEP**: Jaboticabal 2 ed. 191 p. 2002.

COUTO, R. H. N. Apicultura: Manejo e produtos por Regina Helena Nogueira Couto e Leomam Almeida Couto. 3 ed. Jaboticabal: **FUNEP**, 193p, 2006.

CRUZ-LANDIN C.. Abelhas: Morfologia e função dos sistemas. São Paulo: Editora **UNESP**, 408p. 2009.

DE JONG, D. In: Polinizadores do Brasil Situação da sanidade das abelhas no Brasil. [www.semabelhasemalimento.com.br](http://www.semabelhasemalimento.com.br), 2013

DE SOUZA, D.A. Aspectos reprodutivos de rainhas africanizadas (*Apis mellifera L.*): influência do peso ao nascer no desempenho das colônias. Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/**USP**. 2009.

DIAS, L. F. Controle biológico da traça da cera. **Informativo Zum Zum**, [S.l.], v. 35, n. 301, p. 7, 2001.

EFROM, C. 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. p.89, 2009.

FREE, J.B. Insect pollination of crops. London, **U.K: Academic Press**, 1993.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J .R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: **FEALQ**, Piracicaba-SP. 920p. v.10. 2002.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R; VENDRAMIM, J. D. Effect of Meliaceae extracts on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 5, p. 607-612, 2004.

GULLAN, P.J.; CRANSTON P.S. Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo: **Roca**, 480p. 2009.

HAMIDUZZAMAN, M. M.; SINIA, A.; GUZMAN-NOVOA, E., & GOODWIN, P. H; Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of invertebrate pathology**, v. 111, n. 3, p. 237-243, 2012.

HATJINA, F.; BIENKOWSKA M.; CHARISTOS L.; CHLEBO R.; et al. A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 3, p. 337-363, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Mel. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/pesquisa> Acesso em 18.06.2014. 2014.

ITAGIBA, M.G.O.R. Noções básicas sobre a criação de abelhas. São Paulo, **Nobel**, 110 p. 1997.

JANZEN, D.H. Ecologia vegetal nos trópicos. São Paulo: EPU (**Série Temas de Biologia: 7**), 79 p. 1980.

KEVAN, P.G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 74. p. 373-393. 1999.

KLEINERT, A.M.P.; RAMALHO M.; CORTOPASSI-LAURINO M.; RIBEIRO M.F.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L.; Abelhas Sociais (Bombini, Apini, Meliponini). In: Bioecologia e Nutrição de Insetos – Base para o Manejo Integrado de Pragas. **Embrapa**. Brasília-DF. 1164p. 2009

LOLI, D.; Termorregulação colonial e energética individual em abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado – **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, Departamento de Fisiologia. 229 p. 2008.

LORENZI, H.; Souza, H.m.; Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras.3.ed. Nova odessa: **Plantarum**, 1:1088. 2001.

MALERBO-SOUZA, D. T; CHARLIER.A.; ROSSI, M.M.;NOGUEIRA-COUTO R. H.; Métodos para Atrair e Repelir a abelha *Apis mellifera* (L.) em cultura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa flavicarpa* Deg.) **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v.25, n1. P.1-8, 2003.

MALERBO-SOUZA, D. T., NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). **Braz J vet Res Anim Sci**, 40, 4, 2003.

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A.L. Frequência e comportamento de abelhas e outros insetos nas flores do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) **Zootecnia Trop.**, 29, 4, 475-484, 2011.

MARCHINI, L.C.; MORETTI, A.C.; OTSUK, I.P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25. n. 1 Campinas, p. 8-17. 2005.

McGREGOR, S.E.; Insect pollination of cultivated crop plants. Washington: **Agriculture Handbook**.USDA.411p. 1976.

MESSAGE D.; SILVA I.C.; FREITAS N.H.A.; JONG. D.; SIMÕES Z.L.P; TEIXEIRA E.W.; Colapso de colônias de abelhas africanizadas no sudeste do Brasil. **ANAIS DO X ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 27. 2012.

MIOTTO, F. M. Pesquisa mostra que Abelhas são biondicadoras de poluição no ambiente. **Jornal Agrosoft Brasil**, Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/103582.htm>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2015. 13 de março 2012.



NRCS – National resources Conservation Service. Pollinators. Washington: USDA, 2008 Disponível em: <http://www.nrcs.usda.gov>>. Acesso em 06.04.2015.

PEREIRA, A., M. Toxicidade de *Lantana camara* (VERBENACEAE) em operárias de *Apis mellifera* L (HYMENOPTERA: APIDAE). Dissertação Mestrado Universidade Estadual Paulista **Julio de Mesquita Filho**. 2005.

PEREIRA, F. M. Avaliação e substituição de rainhas de abelhas africanizadas. **Jornal Agrosoft Brasil**, Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/103582.htm>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2015. 24 dez 2008.

POLANCZYK, R. A., Pratissoli, D., Dalvi, L. P., Grecco, E. D., & Franco, C. R. Effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on the biological parameters of *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 34(6), 1412-1416. 2010.

POTRICH, M., ALVES, L. F., HAAS, J., DA SILVA, E. R., DAROS, A., PIETROWSKI, V., & NEVES, P. M.. Selectivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical entomology**, 38(6), 822-826. 2009.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, NC de. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, 2007.

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

SANTOS JR. H.J.G.; MARQUES, E.J.; BARROS R.; GONDIM JR. M.G.C.; Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o Parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov)(Hymenoptera: Eulophidae) sobre Larvas da Traça-das-Crucíferas, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 241-245, 2006.

SILVA, P. H. S; CARNEIRO, J. S; CASTRO, M. J. P. de; LOPES T. R.L. Ação biocida de óleos vegetais em ovos e ninfas da mosca-branca-do-cajueiro e operárias adultas de *Apis mellifera* L. **Comunicado Técnico: 205 Embrapa**, Teresina, PI. 2007

SILVA, R.T.L.S. Efeito de micro-organismos entomopatogênicos e extratos vegetais sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). Dissertação Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná –**UTFPR Dois Vizinhos** Pr. 109 p. 2014.

SIMÕES, T.G.; CRISTIANO, M.P.; LISBOA, L.C.O.; CAMPOS, L.A.O.; SERRÃO, J.E; Anais do IX Encontro sobre Abelhas: Genética e Biologia Evolutiva de Abelhas. **FUNPEC** Ribeirão-SP. 2010.

SINGARAVELAN, N. et al.; The effects of nectar-nicotine on colony fitness of caged honeybees. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 1, p. 49-59, 2006.

SMANIOTTO, L. F., DE GOUVEA, A., POTRICH, M., DA SILVA, E. R. L., DA SILVA, J, & PEGORINI, C. S.B Seletividade de produtos alternativos a *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). **Semina: Ciências Agrárias**, 34 (6 Supl1), 3295-3306. 2013.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MACEDO, N. PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B., Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. **Controle microbiano de insetos**, 2, 1097-1118. 1998.

SOUZA, D. L., EVANGELISTA-RODRIGUES, A., RIBEIRO, M. N., PADILLA ÁLVAREZ, F., FARIAS, E. S. L., & PEREIRA, W. E. Análises morfométricas entre *Apis mellifera* da mesorregião do sertão paraibano. **Archivos de zootecnia**, 58(221), 65-71. 2009.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A. PINTO, M.S.C. As Abelhas Como Agentes Polinizadores (The Bees Agents Pollinizer's). **REDVET. Revista eletrônica de Veterinária**, v.III, n03. 2007.

THULER, R. T., BORTOLI, S. D., GOULART, R. M., VIANA, C. L. T. P., & PRATISSOLI, D. Interação tritrófica e influência de produtos químicos e vegetais no complexo: brássicas x traça-das-crucíferas x parasitóides de ovos. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(4), 1154-1160. 2008.

VanDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Application methods for *Bacillus thuringiensis* used to control larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) on stored bee swax combs. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 3, p. 766-771, 1990a.

VanENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; HAYES JR, J.; An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 –2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. **American Bee Journal**, v.147, p.599-603, 2007.

VanENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K. FRAZIER, M.; FRAZIER, J. COX- FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R. M.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **PloS ONE**, v.4, p.e6481, 2009.

VIANNA, B.F.&SILVA, F.O. Polinização por abelhas em agroecossistemas. In: **Congresso brasileiro de apicultura**, 16. Aracaju. Anais. 2006.

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

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

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B.; Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 38, 1933-1407, 2003.

WOLFF, L.F. Apicultura Sustentável na propriedade familiar de base Ecológica. Pelotas: **Embrapa** Clima temperado 16p. (Circular Técnica 64) 2007.

WOLFF, L.F. Controle Biológico de Traça-da-cera com *Bacillus thuringiensis* para a conservação de favos na apicultura sustentável e agricultura familiar. Pelotas: **Embrapa** Clima temperado. 23p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 97) 2009.

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

### 3 CAPÍTULO I- EFEITO DOS AGENTES DE CONTROLE SOBRE A MORFOMETRIA DE RAINHA DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADAS

#### 3.1 RESUMO

A agricultura orgânica é uma prática cultural em expansão. Nela são utilizados agentes de controle biológico e/ou alternativo para o controle de doenças e pragas. Estes agentes de controle, apesar de serem considerados seguros às plantas ainda carecem de informações sobre o efeito em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de agentes de controle sobre a morfometria de rainhas de *A. mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Estabeleceram-se quatro tratamentos: água destilada esterilizada com Tween® (0,01%) (testemunha), água destilada esterilizada (testemunha), o fungo entomopatogênico comercial Boveril®  $1,0 \times 10^8$  (*Beauveria bassiana*) e extrato aquoso de Romã (*Punica granatum*) na concentração de 5%. Cada tratamento com 30 repetições, sendo cada rainha considerada uma unidade experimental. Trinta cúpulas, contendo uma larva de operária cada, foram colocadas em um sarrafo no núcleo superior de cada minirrecria contendo um tratamento. Dez dias após a transferência das larvas, as realeiras foram levadas à estufa para criação de rainhas, com temperatura média de  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $60 \pm 5\%$ . A emergência das rainhas foi monitorada e, na sequência, estas foram anestesiadas com  $\text{CO}_2$  para determinação das medidas de peso vivo (mg), comprimento e largura de asa, abdome e tórax e altura do tórax (mm). Quatro dias após a introdução das cúpulas com as larvas, foram retiradas glândulas hipofaríngeas de 20 operárias amas para a realização análise histológica. O maior peso à emergência das rainhas de *A. mellifera* foi de 233,63 mg para as que entraram em contato com *B. bassiana*, não diferindo da testemunha com água destilada. O tempo a emergência de rainhas provenientes do tratamento com *B. bassiana* diferiu dos demais, 736,14 minutos, sendo o tratamento com menor tempo de emergência. O extrato de *P. granatum* interferiu no comprimento (4,60 mm), na largura (4,60mm) e na altura do tórax (4,90mm), sendo o tratamento com os maiores valores. Já os parâmetros biológicos comprimento e largura da asa e abdome não diferiram, quanto aos valores, entre os tratamentos.

**Palavras-chave:** abelhas, *Punica granatum*, *Beauveria bassiana*.

## ABSTRACT

Organic agriculture is a cultural practice in expansion. In they are used biological control agents and / or alternative for the control of diseases and pests. These control agents, although they are considered safe to plants still lack information on effects on honeybee *Apis mellifera*. Thus, this study aimed to evaluate the effect of control agents on the biological parameters of *A. mellifera* L. queens (Hymenoptera: Apidae). They set up four treatments: sterile distilled water with Tween (0.01%) (control), sterile distilled water (control), the trade Boveril® 1,0x10<sup>8</sup> entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) and aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum*) at a concentration of 5%. Each treatment with 30 repetitions, with each queen considered an experimental unit. Thirty domes, containing a worker larva each, were placed in a batten in the top center of each minirrecria containing treatment. Ten days after the transfer of larvae, realeiras were taken to the greenhouse for breeding of queens with an average temperature of 34 ± 2 °C and relative humidity of 60 ± 5%. The emergence of queens was monitored and as a result, they were anesthetized with CO<sub>2</sub> to determine the body weight measures (mg), length and width of wing, abdomen and chest and chest height (mm). Four days after the introduction of the domes with the larvae, workers hipofaringeanas glands were removed 20 love for performing histological analysis. The greater weight to the emergence of the queens of *A. mellifera* was 233.63 mg for those who came in contact with *B. bassiana*, not differing from the control with distilled water. The time emergency queens from the treatment with *B. bassiana* differed from the others, 736.14 minutes, with treatment with lower emergency time. The *P. granatum* extract interfered in length (4.60 mm), width (4,60mm) and at the height of the chest (4,90mm), and treatment with the highest values. As for the biological parameters length and width of the wing and abdomen did not differ as to the values, between treatments.

**Keywords:** bees, *Punica granatum*, *Beauveria bassiana*.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A maior parte das espécies de plantas necessita de algum tipo de animal como aves, mamíferos ou insetos para realizar a polinização. As estimativas indicam que 73% das espécies vegetais cultivadas são polinizadas por alguma espécie de abelhas (FAO, 2004).

As abelhas dependem das flores para sua sobrevivência, pois obtêm nelas os açúcares de que necessitam para obter energia calórica e o pólen, que é sua fonte de proteínas. E é nas visitas às flores para buscar recursos alimentares que as abelhas executam a polinização. Como polinizadoras transportam, durante o vôo, os grãos de pólen de uma flor, que são os seus gametas masculinos, para o estigma, o receptor do aparelho feminino de outra flor da mesma espécie. Assim sendo, durante o dia todo, durante suas viagens de busca de alimento, as abelhas retribuem, às plantas que lhes forneceram alimento, com um serviço de fertilização cruzada que resulta em frutos de melhor qualidade e maior número de sementes. Este mutualismo é uma relação benéfica para as duas partes (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2004).

Para proteção destes agentes polinizadores e conservação da biodiversidade do meio ambiente, podem ser utilizados métodos conservacionistas que integram o manejo integrado de pragas, como a utilização do controle alternativo e biológico para controle de pragas na agricultura, que vem sendo utilizados pela grande incidência de insetos-praga e precisam ser eficientes no controle que se propõe, sem prejudicar insetos não-alvos como as abelhas e os demais polinizadores.

*Apis mellifera* se mostra suscetível a produtos à base de neem (*Azadirachta indica*), apresentando irregularidades no desenvolvimento e grande mortalidade das larvas, redução da área de cria, toxicidade em pupas, reduz a emergência e causa mal formações dos adultos e grande mortalidade de rainhas nas colônias. Este autor testou alimentação de operárias criadas em laboratório, sendo que o tratamento água e flores de neem foi aquele que provocou 100% de mortalidade nas abelhas nos quatro dias iniciais do experimento (ALVES, 2010).

Os óleos vegetais de mamona (*Ricinus communis* L.) (dose de 2,0 L/100 L água), de neem (*Azadirachta indica*)(2,0 L/100 L água) e de soja (*Glycine max*) (2,0L/100 L água), foram aplicados em papel e colocados em frascos de vidros e após contato direto por 24, 48 e 72 h com os produtos, não afetando a longevidade das operárias adultas de *A. mellifera*, nem causando mortalidade acima de 91% em ninfas da mosca-branca do cajueiro *Aleurodicus cocois* (Curtis, 1846) (Hemiptera: Aleyrodidae) (SILVA et al., 2007).

Óleo de neem (Dalneem-Dalquim dose 5mL/L) e o extrato pirolenhoso (Biopirrol 7M–Biocarbo, dose de 2mL/L) foram aplicados na dose recomendada, um quarto, metade e o dobro da dose, sendo depositados diretamente sobre o tórax de operárias de *A. mellifera* e após 24 e 48 horas, os produtos foram considerados inócuos quanto a sua toxicidade às abelhas (MEIRELLES et al., 2008).

O fungo *B. bassiana* também é utilizado nos cultivos orgânicos, e o conhecimento do seu impacto sobre os organismos não alvos é de relevada importância. Foi testado o fungo *B. bassiana* para o controle de *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), praga da canola, (*Brassica napus* L.) na forma de vetorização da abelha *A. mellifera*. Foram testados três isolados de *B. bassiana*, ARSEF 3769, BB008 e GHA, apresentando controle sobre o *Lygus lineolaris* e não demonstrando nenhum efeito prejudicial para as abelhas (AL MAZRA'AWI et al., 2006).

Hamiduzzaman et al. (2012) testou três isolados de cada um dos fungos, *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana* e *Clonostachys rosea*, para o ácaro, *Varroa destructor*. Os ácaros foram inoculados com os fungos testados e colocados no interior da colmeia. Após sete dias, o melhor resultado foi para *M. anisopliae* com alta mortalidade do ácaro (90%) e relativamente baixa mortalidade das abelhas (24%). Já *B. bassiana* controlou o ácaro com mortalidade próxima a 90% mas apresentou mortalidade de 59% das abelhas.

Ahmed et. al (2013) testou duas preparações comerciais: Bioranza® (*Metarhizium anisopliae*) e Biovar® (*Beauveria bassiana*) e foram avaliados através da aplicação nas colmeias contra ácaro varroa. Após 7 e 14 dias, analisando o peso



médio das operárias, antes e depois dos tratamentos, não foram observadas diferenças entre as colmeias.

Neste sentido, observa-se que os estudos são focados no efeito sobre as operárias, assim, avaliar os efeitos dos agentes de controle sobre a morfometria das rainhas é fundamental para prospectar os possíveis efeitos sobre a colmeia e sobre organismos não-alvos em geral, como os polinizadores. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de agentes de controle sobre os parâmetros biológicos como peso vivo, comprimento e largura da asa e abdome, comprimento, largura e altura do tórax das rainhas de *A. Mellifera* em campo.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

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

#### 3.3.1 Obtenção do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana* foi obtido através do produto comercial Boveril®. A concentração utilizada dos produtos foi àquela recomendada pelo fabricante, conforme utilizado a campo, de 2,0 Kg por hectare.

#### 3.3.2 Obtenção do extrato vegetal de *Punica granatum*

A planta utilizada de romã (*Punica granatum* L.) (Punicaceae) para a obtenção do extrato foi coletada no período matutino e transferida para estufa de secagem (60°) por 48 h. As partes utilizadas da planta foram as folhas, que foram moídas a granulometria de 0,5 milímetros (mm), obtendo-se um pó fino, sendo

armazenado em recipiente de vidro fechado, mantido em temperatura ambiente e protegido de luz. Como solvente extrator foi utilizada água destilada esterilizada, adicionando-se 5 g de pó em 100 mL de água. Em seguida os frascos foram vedados e envoltos em papel alumínio, permanecendo por 48h acondicionadas em caixa de papelão. Na sequência a mistura foi filtrada, em papel filtro duplo esterilizado em membrana de porosidade de 0,45mm, sobre um funil de Buckner conectado a um Kitasato acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm, sendo a solução final armazenada em frascos esterilizados e fechados para posterior utilização nos bioensaios.

### 3.3.3 Obtenção de rainhas *Apis mellifera* africanizadas

Foram produzidas um total de 120 rainhas, em 4 minirrecrias. O método utilizado foi o de Doolittle (1889), que consiste na transferência de larvas de operárias para cúpulas acrílicas contendo geleia real. A idade das larvas foi padronizada para 0 a 24 horas, pois segundo TARPY et al. (2000), as mais jovens originam rainhas maiores.

Para cada tratamento foram utilizadas trinta cúpulas, contendo uma larva de operária cada, foram colocadas em um sarrafo no núcleo superior de cada minirrecria, compostos de dois núcleos sobrepostos separados por uma tela excludora. As transferências foram feitas com temperatura média de 25°C e umidade relativa média de 70%. Dois dias após a transferência de larvas, foram realizadas contagem das realeiras para quantificar a aceitação das larvas (Tabela 1). Dez dias após a transferência das larvas, as realeiras foram retiradas das minirrecrias, alocadas verticalmente em frascos de vidro de 20 mL esterilizados, contendo papel e alocados em estufa tipo BOD para a criação de rainhas, com temperatura média de  $34\pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $60\pm 5\%$ .

A emergência foi monitorada ininterruptamente. As rainhas recém emergidas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> e as medidas de pesos vivo, largura e comprimento da asa e abdome e largura, comprimento e altura do torax tomadas.

**Tabela 1 - Aceitação das realeiras de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com os agentes de controle. UTPFR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Quantidade de realeiras	Aceitação de larvas
Testemunha (Água destilada esterilizada)	30	23
Testemunha (Água e Tween®)	30	21
Extrato Romã ( <i>P. granatum</i> )	30	24
Boveril® ( <i>B. bassiana</i> )	30	24

#### 3.3.4 Agentes de controle sobre a morfometria de rainhas de *Apis mellifera*

O agente de controle foi incorporado em um tecido tipo gaze, sendo este tecido banhado com 200 ml de solução, no interior de um recipiente até o completo umedecimento deste. Em seguida o tecido foi colocado na câmara de fluxo laminar horizontal por 30 minutos para completa evaporação da água. Este procedimento foi repetido para o tratamento contendo extrato de *P. granatum*, o tratamento contendo *B. bassiana*, a testemunha de água destilada esterilizada e a testemunha água destilada esterilizada contendo Tween® 80 (0,01%). A testemunha água destilada esterilizada contendo Tween® 80 (0,01%) foi utilizada para comparar os resultados com o tratamento *B. bassiana*.

O tecido contendo o agente a ser testado foi envolto em uma placa de acrílico, que foi acondicionada no interior de colônias tipo minirrecrias (SANTOS & MESSAGE, 1980), sendo utilizada uma placa para cada tratamento e para cada minirrecria.

A partir da emergência das rainhas, estas foram monitoradas de 10 em 10 minutos, por 2555 minutos, sendo que as rainhas recém-emergidas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> para determinação das medidas de peso vivo (mg), com auxílio de uma balança de precisão de 0,001g (Figura 1A), comprimento e largura de asa e abdome, comprimento e largura e altura do tórax (mm) com auxílio de

paquímetro digital de precisão (Figura 1B). Também foi monitorado e anotado o horário da emergência das rainhas.

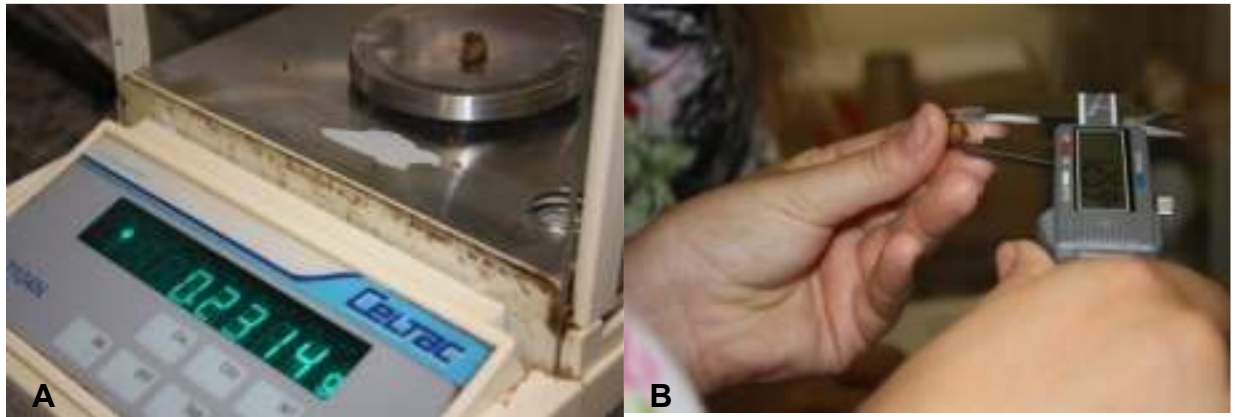


Figura 1: Mensurações das rainhas de *A. mellifera* à emergência. A: Balança analítica com rainha de *A. mellifera* para mensuração de peso à emergência. B: Paquímetro digital para mensuração do comprimento, altura e largura do tórax, asa e abdome.

### 3.3.5 Histologia das operárias amas

Quatro dias após a introdução das realeiras foram retiradas 20 operárias amas de cada tratamento, operárias estas que estavam cuidando diretamente das realeiras. Estas abelhas foram retiradas das minirrecrias em gaiolas próprias para o transporte e levadas até o laboratório onde foi feita a dissecação da cabeça com o auxílio de pinças e alfinetes e as glândulas hipofaríngeas foram extraídas para a realização da análise histológica com posterior avaliação qualitativa das estruturas secretoras.

As amostras foram fixadas em Fixador Bouin (250 mL de formaldeído 40% + 50 mL ácido acético glacial PA + 750 mL de solução saturada de ácido pícrico 1,4%) por 2h, lavadas em álcool 70% por 1 hora. Foi realizada mais uma lavagem em álcool

70% por 10 horas. Depois ficaram armazenadas em álcool 70% até o processamento.

As amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas por imersão em álcool de diferentes concentrações: (álcool 80%: 30 minutos, álcool 90%: 30 minutos, álcool 95%: 30 minutos e álcool 100% I: 20 minutos, álcool 100% II: 20 minutos), sendo posteriormente diafanizadas por imersão em xilol (xilol 100%: 20 minutos; Xilol I: 30 minutos e Xilol II: 30 minutos), Na sequência foi realizada a parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1 120 minutos; Parafina Histológica I: 60 minutos) e o emblocamento em Parafina histológica (Parafina Histológica/cera de abelha 4:1), conforme metodologia adaptado de Potrich (2010).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo rotativo manual, em cortes de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, montados em lâmina de vidro de ponta fosca para microscopia (3,0x10,0 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 realizada a desparafinização (Xilol I: 5 minutos, Xilol II: 5 minutos) e a reidratação destes (álcool 100%: 5 minutos, álcool 95%: 5 minutos, álcool 70%: 10 minutos e depois lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em hematoxilina (4 minutos), lavados em água corrente, banhados em eosina (2 minutos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em estufa a 35°C por dois dias, para que os corantes sequem, e foram recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cmx3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio Biológico de luz Opton trinocular TNB-40T-PL, e as imagens capturadas com câmera digital DCM 310 (USB 2.0) 3M pixels, CMOS, utilizando o programa software Scope Tekminisee Version 1.1.3.0.

### 3.3.6 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado no bioensaio para análise foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 30 repetições cada, sendo cada rainha considerada uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, com 5% de significância no programa Assisat versão 7.7 beta (SILVA, 1996, 2002, 2006, 2009).

## 3.4 RESULTADOS

### 3.4.1 Ação dos Agentes de Controle sobre a morfometria de rainhas de *Apis mellifera*

O peso vivo à emergência das rainhas de *A. mellifera* não foi reduzido pela presença do extrato de romã (*P. granatum*) (210,56 mg) e nem pela presença de Boveril® (*B. bassiana*) (233,63 mg), quando comparados às testemunhas. O que observou-se foi maior peso à emergência em rainhas provenientes do tratamento com Boveril® (*B. bassiana*), comparado ao tratamento testemunha (Água e Tween®) (206,70 mg) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Peso ( $\pm$ EP) a emergência de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Rainhas emergidas	Peso médio(mg) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween®)	18	206,70 $\pm$ 3,40 c
Testemunha (Água Destilada)	22	226,48 $\pm$ 3,03 ab
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	210,56 $\pm$ 9,09 bc
Boveril® ( <i>B. bassiana</i> )	21	233,63 $\pm$ 4,37 a
<i>P</i>		0,0003

<sup>a,b,c</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Tukeyem nível de 95% de credibilidade.

EP: Erro Padrão

O tempo de emergência das rainhas de *A. mellifera* alimentadas por operárias que entraram em contato com os tratamentos de extrato de romã (*P. granatum*) (1350,78 minutos) e Água e Tween® (1459,61 minutos), Água Destilada (1432,63 minutos) não diferiram. No entanto, o tempo de emergência das rainhas provenientes do tratamento com o Boveril® (*B. bassiana*) foi menor (736,14 minutos) do que os demais, diferindo destes (Tabela 3).

**Tabela 3 - Tempo de emergência ( $\pm$ EP) de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Rainhas emergidas	Tempo (min.) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween®)	18	1459,61 $\pm$ 144,75 a
Testemunha (Água Destilada)	22	1432,63 $\pm$ 149,41 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	1350,78 $\pm$ 121,06 a
Boveril® ( <i>B. bassiana</i> )	21	736,14 $\pm$ 124,74 b
<i>P</i>		0,0005

<sup>a,b</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Tukeyem nível de 95% de credibilidade.  
EP: Erro Padrão

A morfometria, comprimento da asa, largura da asa, comprimento do abdome e largura do abdome das rainhas de *A. mellifera*, alimentadas por operárias que entraram em contato com os tratamentos, não apresentaram variação quando comparados com as testemunhas (Tabela 4).

**Tabela 4 - Comprimento ( $\pm$ EP) e largura ( $\pm$ EP) da asa e abdome das rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinho, 2015.**

Tratamento	Rainhas emergidas	Comprimento Asa (mm) $\pm$ EP	Largura Asa (mm) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	18	10,31 $\pm$ 0,12 a	3,36 $\pm$ 0,06 a
Testemunha (ÁguaDestilada)	22	10,31 $\pm$ 0,14 a	3,38 $\pm$ 0,06 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	10,41 $\pm$ 0,12 a	3,46 $\pm$ 0,09 a
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	21	10,19 $\pm$ 0,15 a	3,51 $\pm$ 0,05 a
P		0,7993	0,274

Tratamento	Rainhas emergidas	Comprimento Abdome (mm) $\pm$ EP	LarguraAbdome (mm) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	18	10,68 $\pm$ 0,12 a	4,78 $\pm$ 0,07 a
Testemunha (ÁguaDestilada)	22	9,98 $\pm$ 0,30 a	4,87 $\pm$ 0,06 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	10,51 $\pm$ 0,27 a	4,96 $\pm$ 0,13 a
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	21	10,76 $\pm$ 0,15 a	4,95 $\pm$ 0,07 a
P		0,0531	0,3896

<sup>a</sup>Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Tukeyem nível de 95% de credibilidade.  
EP: Erro Padrão

O comprimento e a largura do tórax das rainhas de *A. mellifera* alimentadas por operárias que entraram em contato com o tratamento de extrato de romã (*P. granatum*) foram maiores que os demais tratamentos (4,60 mm para ambos), diferindo da testemunha com água. Para o parâmetro altura do tórax, os tratamentos extrato de romã (*P. granatum*) (4,90 mm) e a testemunha Água Destilada (4,87 mm) não diferiram entre si e apresentaram as maiores medidas (Tabela 5).



**Tabela 5 – Comprimento ( $\pm$ EP), largura ( $\pm$ EP) e altura ( $\pm$ EP) do tórax de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Rainhas emergidas	Comprimento Tórax(mm) $\pm$ EP	LarguraTórax (mm) $\pm$ EP	AlturaTórax (mm) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	18	4,10 $\pm$ 0,12 b	4,35 $\pm$ 0,06 ab	4,83 $\pm$ 0,08ab
Testemunha (ÁguaDestilada)	22	4,23 $\pm$ 0,11 ab	4,22 $\pm$ 0,08 b	4,87 $\pm$ 0,06 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	4,60 $\pm$ 0,13 a	4,60 $\pm$ 0,13 a	4,90 $\pm$ 0,07 a
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	21	4,41 $\pm$ 0,10 ab	4,45 $\pm$ 0,09 ab	4,61 $\pm$ 0,06 b
P		0,0197	0,0223	0,0116

<sup>a,b</sup> Letras distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Tukeyem nível de 95% de credibilidade.  
EP: Erro Padrão

O comprimento total do corpo das rainhas de *A. mellifera*, alimentadas por operárias que entraram em contato com os tratamentos, não foi afetado, não se observando diferenças entre os tratamentos (Tabela 6).

**Tabela 6 - Comprimento total ( $\pm$ EP) do corpo de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

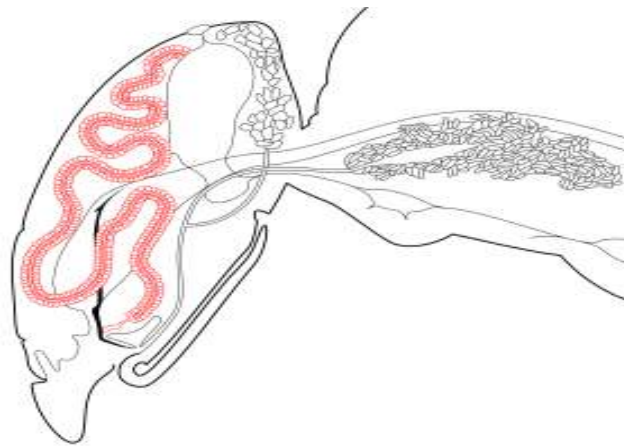
Tratamento	Rainhas emergidas	Comprimento Total (mm) $\pm$ EP
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	18	16,61 $\pm$ 0,20 a
Testemunha (ÁguaDestilada)	22	16,35 $\pm$ 0,33 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	14	17,06 $\pm$ 0,43 a
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	21	16,58 $\pm$ 0,23 a
P		0,4447

<sup>a</sup>Letra distintas indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do teste de Tukeyem nível de 95% de credibilidade.

EP: Erro Padrão

#### 3.4.2 Histologia

Verificou-se que as glândulas hipofaríngeanas (Figura 2) das operárias de *A. mellifera* que entraram em contato com os agentes de controle, não apresentaram diferenças qualitativas significativas entre os tratamentos testados, Boveril<sup>®</sup> (*B. bassiana*), extrato de romã (*P. granatum*) e as testemunhas Água + Tween<sup>®</sup> e Água Destilada. As estruturas secretoras das glândulas hipofaríngeanas possuem forma esférica e são chamadas de ácidos e ao serem analisadas qualitativamente não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Figura 3 e 4).



© Adam Totik - www.honeybee.drawing.org

Figura 2 - Vista Lateral da Glândula Hipofaríngea (em vermelho) de abelhas de *Apis mellifera*. Fonte: honeybee.drawing.org.

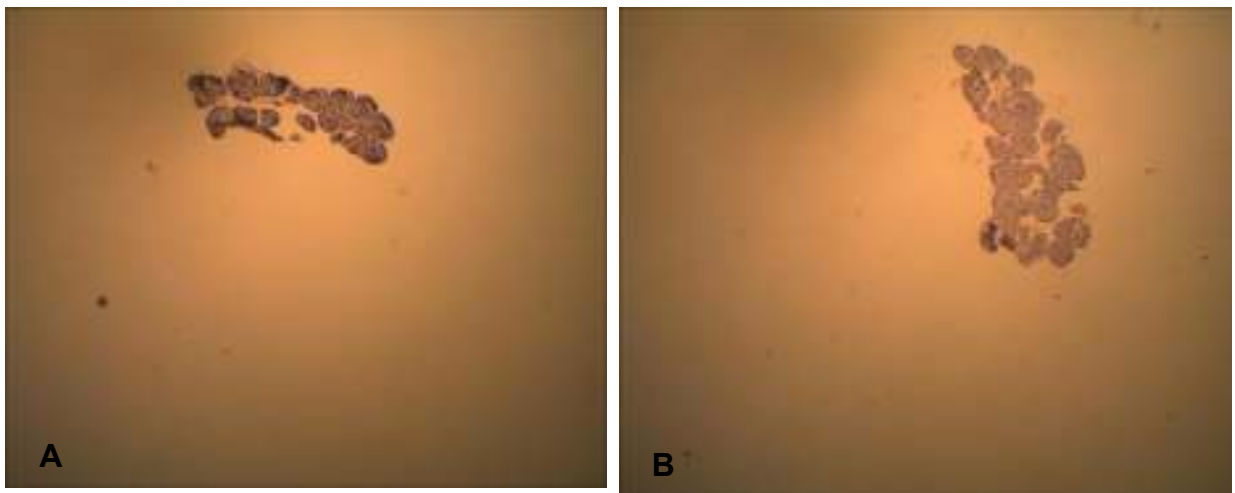


Figura 3 - A: Glândula hipofaríngea com tratamento Boveril®. (*B. bassiana*)  
B: Glândula Hipofaríngea com tratamento extrato de romã (*P. granatum*).

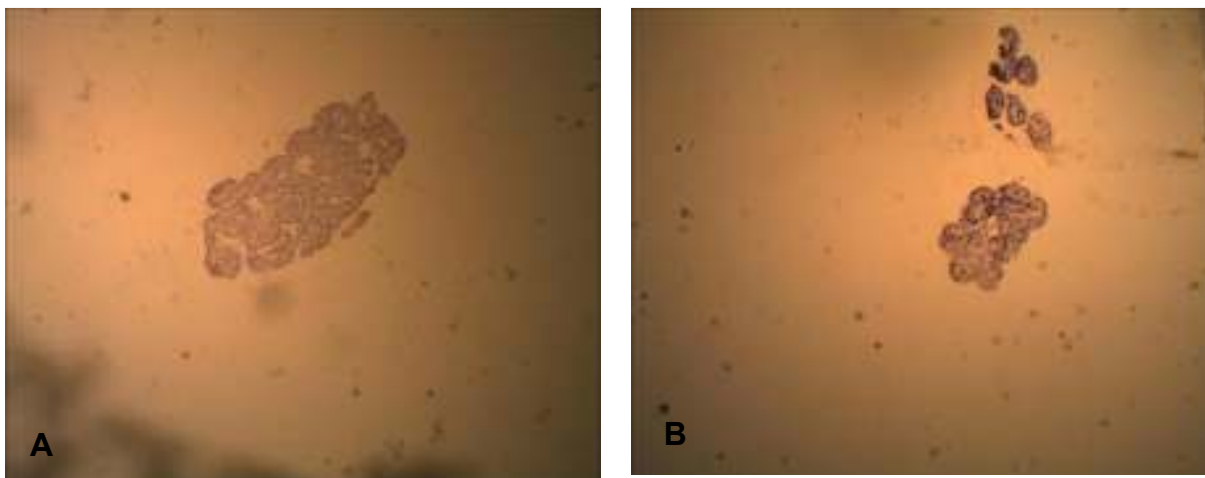


Figura 4 - A: Glândula Hipofaringeana com tratamento Água + Tween® Em B: Glândula Hipofaringeana com tratamento Água Destilada.

### 3.5 DISCUSSÃO

Não foram encontrados estudos e pesquisas na literatura sobre a morfometria de rainhas de *A. mellifera* que entraram em contato com agentes de controle biológicos e/ou alternativos.

O peso das rainhas virgens variou entre 134,00 e 247,00mg, apresentando média de  $165,42 \pm 17,63$ mg, enquanto que o peso das fecundadas (12 dias após a introdução nos núcleos) variou de 172,00 a 376,00mg, com média de  $230,21 \pm 25,35$ mg. Halak (2012) comenta a escassez, na literatura, de dados morfométricos e de pesagem em *A. mellifera* africanizada quando comparados a trabalhos com abelhas européias, dados estes que teriam intuito de seleção para incremento na produção de mel.

O presente trabalho se destaca, por trazer informações sobre os efeitos dos agentes de controle sobre a morfometria de rainhas de *A. Mellifera* africanizadas. No presente trabalho, o peso à emergência das rainhas, observada no experimento em que as operárias entraram em contato com o produto Boveril® (*B. bassiana*), foi

233,63 mg. Outros autores, testando esta característica encontraram valores que ficaram dentro desta amplitude. Costa (2005), estimando parâmetros genéticos e fenotípicos para peso, observou média de peso de rainhas à emergência de 184,80 mg. Os valores encontrados por Faquinello (2007) foram de 209,34mg. Já Costa-Maia (2009) encontrou valores para o peso de rainhas à emergência de 197,4 mg. Halak (2012) encontrou valor médio para de rainhas à emergência de 215,64 mg ( $\pm 23,9$  mg).

O tamanho da rainha pode ser usado como medida de seleção, pois quanto mais pesa a rainha, maior o seu sistema reprodutor, sua longevidade e sua qualidade (SOUZA, 2009). Uma vez que o agente de controle não interfere no peso da rainha, infere-se que outras características não serão afetadas, ou ainda, serão pouco afetadas.

No trabalho realizado, o maior valor encontrado para o comprimento do abdome (10,76 mm) e para peso (233,63 mg) foram para o tratamento Boveril® (*B. bassiana*).

Os valores encontrados para o comprimento do abdome foram parecidos em alguns trabalhos sobre a morfometria da *A. mellifera*. Costa (2005) observou média de  $9,9 \pm 0,58$  mm para esta característica, e Costa-Maia (2009) encontrou média de  $10,61 \pm 0,97$  mm. Já para Faquinello et al. (2011) o valor médio do comprimento de abdome ficou próximo de 11,0 mm. Halak (2012) encontrou o valor médio para comprimento de abdome de 11,65 mm ( $\pm 0,9$  mm).

Halak (2012) utilizando parâmetros e correlações para peso e medidas em rainhas de *A. mellifera*, concluiu que as características como o peso, comprimento de abdome e largura de abdome são passíveis de serem utilizadas como critério de seleção em um programa de melhoramento, e as características, peso e comprimento do abdome são mais indicadas para se obter ganhos de seleção em abelhas africanizadas. No trabalho executado, o tratamento em que as rainhas apresentaram maior peso, comprimento e largura do abdome foi com o agente de controle Boveril® (*B. bassiana*). Como este agente de controle não interferiu na qualidade das rainhas pode ser avaliado como promissor num programa em qua

houver a necessidade da utilização deste, sem interferir num programa de melhoramento genético. O outro agente testado, extrato de Romã (*P. granatum*), também não apresentou efeito negativo sobre os parâmetros analisados nas rainhas de *A. mellifera*.

Para a largura do abdome de rainhas africanizadas de *A. mellifera*, não houve diferenças entre os tratamentos testados, sendo que a largura variou de 4,78 mm para o tratamento testemunha (Água e Tween®) a 4,96 mm para o tratamento com extrato de romã (*P. granatum*). Estes valores são próximos aos valores de comprimento de abdome de rainhas de *A. mellifera* encontrados por outros autores. Costa (2005) observou valor de 4,6 mm ( $\pm 0,04$  mm), da mesma forma, Costa-Maia (2009) encontrou  $4,96 \pm 0,44$  mm, enquanto Faquinello et al. (2011) obteve valor médio de 4,6 mm. Halak (2012) verificou média de  $5,21 \pm 0,41$  mm de largura de abdome.

Para o parâmetro comprimento da asa de rainhas de *A. mellifera*, não houve diferença entre os tratamentos testados, sendo que o comprimento variou de 10,19 mm para o tratamento Boveril® (*B. bassiana*) a 10,41 mm para o tratamento com extrato de romã (*P. granatum*). Costa (2005) observou 9,9mm, enquanto Faquinello (2007) verificou que as rainhas apresentaram comprimento de asa de 11,0 mm.

A largura da asa de rainhas de *A. mellifera* também é um parâmetro a ser investigado e está relacionado, juntamente ao comprimento da asa e demais parâmetros, com a qualidade da rainha. Na literatura, verifica-se que a largura da asa de rainhas africanizadas de *A. mellifera* apresenta valores de 3,7 mm (COSTA, 2005; FAQUINELLO, 2007). Estes valores são próximos aos observados para a largura de asa das rainhas de *A. mellifera*, submetidas indiretamente aos diferentes agentes de controle (3,36 mm para o tratamento Água e Tween® e 3,51 mm para o tratamento Boveril® (*B. bassiana*)).

A morfometria, comprimento, largura e altura do tórax de rainhas de *A. mellifera*, em contato com os diferentes tratamentos (*B. bassiana* e extrato de romã), sofreram pouca interferência, quando comparados às respectivas testemunhas. No

entanto, pouco se conhece na literatura sobre as mensurações desses parâmetros e a influência destes na qualidade de uma rainha.

Os parâmetros mencionados na revisão demonstram que o peso da rainha e comprimentos do abdome são as medidas mais utilizadas para selecionar indivíduos para potencializar a produção de mel.

O agente de controle utilizado extrato de romã (*P. granatum*) teve pouca interferência nas rainhas de *A. mellifera*, o que, segundo Antonious (2004), está relacionado ao fato de alguns extratos vegetais apresentarem rápida degradação, permanecendo menos tempo exercendo seu efeito tóxico sobre as abelhas, o que poderia explicar a baixa interferência destes sobre estas.

Xavier (2009) também explica a ação dos extratos vegetais como um produto onde ocorre degradação muito rápida. Este processo aumenta o potencial de segurança às abelhas, mas, pode não controlar os insetos pragas a níveis requisitados, já que a rápida degradação dos compostos pode ocorrer antes do inseto praga entrar em contato com o extrato.

Nas abelhas *A. mellifera* as glândulas hipofaríngeas se caracterizam por apresentar cachos muitos longos e enrolam-se sobre e sob o cérebro. Como os cachos são muitos longos, permitem a ligação de muitas células secretoras, que se conectam agrupadas ao duto axial. As unidades secretoras das glândulas hipofaríngeas possuem a forma esférica denominadas de ácinos ou alvéolos e não apresentam ligação entre si. Estes ácinos são constituídos por uma média de cinco células, mesmo assim independente, isto é, continua tendo um canal coletor de secreção intracelular e um canal excretor próprio que a liga ao duto axial (CRUZ-LANDIM, 2006). No trabalho executado, como não houve diferenças entre os agentes testados, pode ser avaliado positivamente por não ter ocorrido alterações em estruturas importantes na produção da geleia real.

### 3.6 CONCLUSÃO

A emergência de rainhas africanizadas de *A.mellifera* do tratamento Boveril® (*B. bassiana*) foi afetado, diminuindo o tempo de emergência quando comparado à testemunha.

O extrato de Romã (*P. granatum*) não afetou nenhum dos parâmetros avaliados em rainhas africanizadas de *A. mellifera*.



### 3.7 REFERÊNCIAS

AHMED, A. A.; ABD-ELHADY, HANY K. Efficacy of two fungus-based biopesticide against the honeybee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 16, n. 16, p. 819-825, 2013.

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

AL MAZRA'AWI, M. S., SHIPP, J. L., BROADBENT, A. B., & KEVAN, P. G.; Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. **Environmental entomology**, v. 35, n. 6, p. 1569-1577, 2006.

ANTONIOUS, G. F. Residues and half-lives of pyrethrins on field-grown pepper and tomato. **Journal of environmental science and health part B- pesticides food contaminants and agricultural wastes**, v.39, n.4, p.491-503.2004.

COSTA, F. M. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para peso e medidas morfométricas em rainhas *Apis mellifera* africanizadas. 39 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – UEM - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2005.

COSTA-MAIA, F. Aspectos genéticos da produção de mel e comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* africanizadas. 81 f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - UEM - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2009.

CRUZ-LANDIN C. Abelhas: Morfologia e função dos sistemas. São Paulo: Editora **UNESP**, 408p. 2009.

DE SOUZA, D.A.; Aspectos reprodutivos de rainhas africanizadas (*Apis mellifera* L.): influência do peso ao nascer no desempenho das colônias. Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/**USP**. 2009.

DOOLITTLE G.M. Scientific Queen Rearing as practically applied. **Chicago**. 163p. 1889.

EFROM, C. F. S., REDAELLI, L. R., MEIRELLES, R. N., & OURIQUE, C.B Side-effects of pesticides used in the organic system of production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 47-53, 2012.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (Eds.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, p 2-19. 2004.

FAQUINELLO, P.; Avaliação Genética em Abelhas *Apis mellifera* Africanizadas para Produção de Geleia Real. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** UEM. Maringá-Pr. 54f. 2007

FAQUINELLO, P., TOLEDO, V. A. A., MARTINS, E. N., OLIVEIRA, C. A. L., SEREIA, M. J, COSTA- MAIA , F. M., RUVOLLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees. **Sociobiology**, v. 57, n 03. P. 495-509. 2011.

HALAK, A.L.; Parâmetros e correlações genéticas e fenotípicas para peso e medidas morfométricas em rainhas *Apis mellifera* africanizadas. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. UEM. Maringá. 46f. 2012.

HAMIDUZZAMAN, M. M.; SINIA, A.; GUZMAN-NOVOA, E., & GOODWIN, P. H; Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of invertebrate pathology**, v. 111, n. 3, p. 237-243, 2012.

HATCH, S., TARPY, D. R., FLETCHER, D. J. C. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. **Insectes Sociaux**, v.46, n.4, p.372-377. 1999.

KAHYA, Y., GENÇER, H. V., WOYKE, J.; Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. **Journal of Apicultural Research** Vol.47, 118-125,2008.

IMPERATRIZ-FONSECA V.L, CONTRERAF. A.L, KLEINERT A.M.P.;A Meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores. In: **XV Congresso Brasileiro de Apicultura**. Natal, RN, p. 1-7. 2004.

MEIRELLES, R.N.; EFROM C.F.S.; REDAELLI, L.R.; Seletividade de produtos à base de neem e Extrato Pirolenhoso a *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). Resumos Salão de Iniciação Científica. **UFRGS** Porto Alegre. 2008.

OLIVEIRA, E.L.V., SILVA, A., MORETI, A.C.C.C., ALVES, M.L.T.M.F., TEIXEIRA, E.W., SILVA, R.M.B. Observações sobre o Peso de Rainhas de Abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) **Mensagem Doce** nº 48. 1998.

POTRICH, M.; Seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e Virulência a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **UEL**- Londrina-Pr. 141f. 2010.

SANTOS, J.J.; MESSAGE, D. Utilização de mini-recrias para a produção de geléia real. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5, 1980. Viçosa. Anais... Viçosa: Universidade Federal de **Viçosa**, p. 307-311. 1980.

SILVA, F.de A.S.E. The ASSISTAT Software: statistical assistance In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais. Cancun: **American Society of Agricultural Engineers**, p.294-298 1996.

SILVA, F. de A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78, 2002.

SILVA, F. de A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. p.393-396. 2006.

SILVA, F. de A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American **Society of Agricultural and Biological Engineers**. 2009.

SILVA, P.H.S.; CARNEIRO, J.S.; CASTRO, M.J.P.; LOPES, M.T.R.; Ação biocida de óleos vegetais em ovos e ninfas da mosca-branca-do-cajueiro e operárias adultas de *Apis mellifera* L. **Comunicado Técnico: 205 Embrapa**, Teresina, PI. 2007

TARPY, D. R., HATCH, S., FLETCHER, J. C. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **Animal Behaviour.**, v.59, n.1, 97-101. 2000.

XAVIER, Vânia Maria. Impacto de Inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae). 2009. 43f. **Dissertação (Mestrado em Entomologia)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

## 4 CAPÍTULO II QUALIDADE REPRODUTIVA DAS RAINHAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) SOB EFEITO INDIRETO DE AGENTES DE CONTROLE

### 4.1 RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos agentes de controle sobre a qualidade de rainhas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Para isto, um pano foi umedecido com o agente de controle e depositado no interior da colônia tipo minirrecrias, onde as operárias, que alimentavam as larvas, entraram em contato. Estabeleceram-se três tratamentos: água destilada esterilizada com Tween® (0,01%) (testemunha), o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Boveril®  $1,0 \times 10^8$ ) e o extrato aquoso de romã (*Punica granatum*) na concentração de 5%. Cada tratamento foi composto por uma minirrecria com 5 quadros, avaliados nos dois lados, totalizando 10 repetições. Trinta cúpulas, contendo uma larva cada, foram colocadas em um sarrafo no núcleo superior de cada minirrecria contendo um tratamento. Após a emergência, cinco rainhas de cada tratamento foram levadas a campo, cada uma delas a uma colmeia previamente orfanada, onde iniciou a postura de ovos nos quadros desta colmeia, sendo então a área de cria mensurada através da captura de imagens e posterior avaliação. As rainhas virgens que não foram utilizadas para mensurar a área de cria foram utilizadas para análise histológica do mesêntero, com avaliação quantitativa. A área de cria das rainhas não apresentou diferença entre os tratamentos, com tamanho médio de  $297,7 \text{ cm}^2$ . Quanto à avaliação do mesêntero, as rainhas que foram alimentadas por operárias que entraram em contato com o extrato de romã apresentaram as maiores vilosidades, com comprimento de  $141,82 \mu\text{m}$  e o tratamento Boveril® (*B. bassiana*) com  $119,10 \mu\text{m}$ , foi o que obteve o menor comprimento das vilosidades do mesêntero.

**Palavras-chave:** área de cria, *Punica granatum*, *Beauveria bassiana*.

## ABSTRACT

This study evaluated the effect of control agents on the quality of queens of Africanized bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). For this, a cloth was moistened with the control agent and deposited inside the minirrecias type colony, where the workers, who fed the larvae contacted. They set up three treatments: sterile distilled water with Tween (0.01%) (control), the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Boveril® 1,0x10<sup>8</sup>) and the aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum*) at a concentration of 5%. Each treatment consists of a frame 5 with minirrecia evaluated on both sides, totaling 10 repetições. Trinta domes, each containing a larva were placed in a lath at the upper core minirrecia each containing a treatment. After emergence, five queens of each treatment were taken to the field, each to a previously orphanada hive, where he started egg laying in the tables of this hive, then being the offspring area measured by the capture and subsequent evaluation. The virgin queens that have not been used to measure creates area were used for histological analysis of the midgut, with quantitative assessment. The area creates Queens did not differ between treatments, with an average size of 297.7 cm<sup>2</sup>. As for the evaluation of the midgut, the queens who were fed by workers who came into contact with the pomegranate extract had the highest villous, with a length of 141,82µm and Boveril® treatment (*B. bassiana*) with 119,10µm, was the who got the shorter length of the villi of the midgut.

**Keywords:** area of brood, *Punica granatum*, *Beauveria bassiana*

## 4.2 INTRODUÇÃO

O uso de agentes de controle, como fungos entomopatogênicos e extratos vegetais são alguns dos recursos utilizados pelos agricultores para o controle de insetos-pragas. Os fungos entomopatogênicos são os principais responsáveis pela mortalidade natural de insetos-praga em agroecossistemas, destacando-se o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (ALVES, 1998).

Os extratos vegetais também são utilizados no controle e na repelência de insetos (PENTEADO, 2010), estes podem ser utilizados em cultivos orgânicos, alternativos e/ou convencionais. Os efeitos de contato, ingestão e fumigação, aliados a baixa toxicidade, rápida degradação no ambiente, eficiência no controle de pragas e segurança para os aplicadores e consumidores evidenciam a importância da utilização deste recurso (COITINHO et al., 2011). São biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos, nem contaminam o ambiente. O desenvolvimento de resistência dos insetos a estas substâncias é lento, além de não deixarem resíduos nos alimentos, sendo seguros aos operadores, e de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores (MARTINEZ, 2002; OLIVEIRA et al., 2007), preservando deste modo os inimigos naturais e organismos não alvos.

Dentre 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).

A rainha é a única fêmea reprodutiva dentro de uma colônia, sendo que o perfeito desenvolvimento da colônia está intimamente relacionado à qualidade destas (HATCH et al., 1999). O potencial reprodutivo é mensurado através dos aspectos referentes ao vôo nupcial (sucesso dos vôos, números de vôos, número de

zangões com os quais acasalam ou ainda a quantidade de sêmen estocado), bem como suas características pós-fecundação (taxa de postura, qualidade e viabilidade da cria, ou ainda a quantidade de feromônios exalados, o que estimula as atividades das operárias) (GILLEY et. al., 2003).

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

Meikle et al. (2008) testou dois isolados de *B. bassiana*, GHA e BB05002, em ácaros varroa (*V. destructor*), e também com o objetivo de avaliar o efeito sobre o peso das abelhas, área de cria e mel. Para o ácaro o resultado foi positivo, pois a proporção de ácaros mortos foi maior que a testemunha. E a avaliação para as abelhas *A. mellifera* foram que os tratamentos não afetaram o desenvolvimento da colônia.

Silva (2014) testou extratos vegetais de manjerona, chapéu de couro, romã e camomila na dieta contaminada e em contato em folhas com a superfície tratada sobre *A. mellifera*, avaliando a mortalidade e concluiu que reduziu a sobrevivência das operárias de *A. mellifera* nos dois bioensaios. Os extratos vegetais manjerona e romã causaram modificações morfométricas, reduzindo o comprimento de células do mesêntero de *A. mellifera*.

Como estas características da rainha se mostram muito importantes para o funcionamento da colmeia, se justifica estudar as interações que podem ocorrer entre os agentes estudados e as rainhas. As rainhas tem menos chance de entrar em contato diretamente com estes agentes, devido a sua função primordial de fecundação, ficando, depois de fecundada, dentro da colmeia, por isso avaliá-las através da alimentação fornecida pelas operárias que tiveram contato com estes agentes de controle pode auxiliar na identificação de efeitos subletais que poderão interferir na produção de cria e consequente produção de mel.



Assim sendo, este trabalho objetivou avaliar a qualidade das rainhas de abelhas africanizadas de *A. mellifera*, quanto à produção de cria, sob efeito indireto de agentes de controle, alternativo e biológico.

#### 4.3 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).

##### 4.3.1 Obtenção dos agentes de controle

O fungo *Beauveria bassiana* foi obtido através do produto comercial Boveril®. A concentração utilizada dos produtos foi àquela recomendada pelo fabricante, utilizado a dosagem de 2,0 kg por hectare.

A planta de romã (*P. granatum*) utilizada para a obtenção do extrato foi coletada no período matutino e transferida para estufa de secagem (60°), por 48 h. As partes utilizadas da planta foram as folhas, moídas em moinho de facas Tipo Willye, a granulometria de 0,5 milímetros (mm), obtendo-se um pó fino. Em seguida foram armazenadas em recipiente de vidro vedado e mantido em temperatura ambiente, sendo protegido de luz até a sua utilização. Foi utilizada água destilada esterilizada como solvente extrator, adicionando-se 5 g de pó em 100 mL de água. Logo após os frascos foram fechados e envoltos em papel alumínio, permanecendo por 48h acondicionadas em caixa de papelão. Na sequência, a mistura foi filtrada, em papel filtro duplo esterilizado em membrana de porosidade de 0,45mm com o funil de Buckner conectado a um Kitasato acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm, sendo a solução final armazenada em frascos esterilizados e fechados até sua utilização no bioensaio.

#### 4.3.2 Obtenção de *Apis mellifera*

As rainhas 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.

As rainhas foram produzidas segundo o método Doolittle (1889), que consiste na transferência de larvas de operárias de favo de cria para cúpulas acrílicas contendo geleia real. No dia seguinte, trinta cúpulas, contendo uma larva de operária cada, foram colocadas em um sarrafo no núcleo superior de cada minirrecria. A transferência foi simples com larvas de idade e genealogia controladas, tendo as larvas entre zero e 24 horas de idade. Dois dias após a introdução das cúpulas nas minirrecrias, foram realizadas contagem das realeiras para quantificar a aceitação das larvas. Dez dias após a transferência das larvas, as realeiras foram retiradas das minirrecrias, alocadas verticalmente em frascos de vidro de 20 mL esterilizados, contendo papel dobrado e alocados em estufa própria para a criação de rainhas, com temperatura média de  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $60\pm 5\%$ .

#### 4.3.3 Influência dos agentes de controle sobre a produção de cria de *Apis mellifera*

O agente de controle foi incorporado em um pano tipo gaze, sendo este banhado com 200 ml de solução, dentro de um recipiente até o umedecimento do pano. Em seguida o pano foi colocado na câmara de fluxo laminar horizontal por 30 minutos para completa evaporação da água.

Este procedimento foi repetido para o tratamento contendo extrato de *P. granatum*, o tratamento contendo *B. bassiana*, a testemunha de água destilada esterilizada e a testemunha água destilada esterilizada contendo Tween® 80 (0,01%). A testemunha água destilada esterilizada contendo Tween® 80 (0,01%) foi utilizada para comparar os resultados com o tratamento com o *B. bassiana*.

O pano contendo o agente a ser testado foi envolto em uma placa de acrílico, que foi acondicionada no interior de colônias tipo minirrecrias (SANTOS &

MESSAGE, 1980), sendo utilizada uma placa para cada tratamento e para cada minirrecria.

Esta placa contendo o pano foi inserida no dia anterior a transferência das larvas para produção de rainhas, para que as operárias entrassem em contato com os agentes de controle.

No dia seguinte à introdução da placa, foi introduzido um quadro com 30 cúpulas. Dois dias após a introdução das cúpulas nas minirrecrias, foram realizadas contagem das realeiras para quantificar a aceitação das larvas. (Tabela 7).

**Tabela 7 - Aceitação das realeiras de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com os agentes de controle. UTPFR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Quantidade de realeiras	Aceitação de larvas
Testemunha (Água destilada esterilizada)	30	23
Testemunha (Água e Tween®)	30	21
Extrato Romã ( <i>P. granatum</i> )	30	24
Boveril® ( <i>B. bassiana</i> )	30	24

Dez dias após a transferência das larvas, as realeiras (Figura 5A) foram retiradas das minirrecrias, alocadas verticalmente em frascos de vidro de 20 mL esterilizados, contendo papel dobrado, colocadas em estufa própria (Figura 5B) para a criação de rainhas, com temperatura média de  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $60\pm 5\%$ .



Figura 5 – Retirada de rainhas de *A. mellifera*. A: Quadro de realeira com as larvas de *A. mellifera*. B: Estufa tipo BOD para a emergência das rainhas de *A. mellifera*.

Após a emergência (Figura 6A) e realizada todas as mensurações das rainhas, inclusive identificação de cada uma delas (Figura 7A e B), cinco rainhas emergidas de cada tratamento foram alojadas em gaiolas plásticas (Figura 6B) próprias para a introdução em colônias órfãs, sendo então introduzidas em colônias de cinco favos voltadas para a produção de mel e cria, previamente orfanadas e manejadas para o recebimento das mesmas (Apêndice 1).

Decorridos sete dias, as colônias foram monitoradas quanto à aceitação das rainhas introduzidas. Confirmada a fecundação, iniciou-se o mapeamento, com a medição da área de cria de cada tratamento.

Para a medição da área de cria, a metodologia adotada foi adaptada de Al-Tikrity et al. (1971) e utilizou-se uma tela graduada de 2,0x2,0 cm (4,0cm<sup>2</sup>) (Figura 8A e B). Nesta tela graduada, foram depositados os quadros e então realizadas duas capturas de imagem (Figura 9), dos cinco quadros de cada tratamento. Estas imagens foram arquivadas e posteriormente mensuradas como área de cria em cm<sup>2</sup>, utilizando o programa Image Tool versão 3.0. Este procedimento foi utilizado para os dois lados do quadro, e realizado a cada sete dias, durante 35 dias, conforme Tabela 8.



Figura 6 - Emergência das rainhas de *A.mellifera*. A: Emergência da Rainha. B: Transferência de rainhas de *A. mellifera* para o apiário UNEPE em gaiolas plásticas próprias para o transporte.

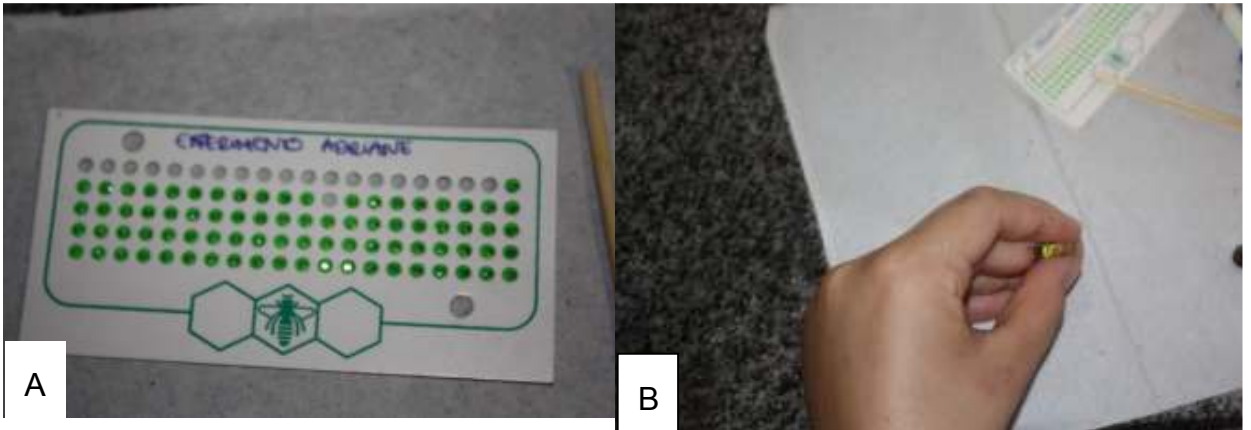


Figura 7 - Etapa de identificação das rainhas de *A. mellifera*. Os adesivos (A) foram colados no tórax (B) para identificação a campo.



Figura 8 - A e B: Preparo da tela graduada para mensuração da área de cria.



Figura 9 - Quadro pronto para captura da imagem, com identificação do quadro.

**Tabela 8 - Datas das realizações das capturas de imagens da área de cria das rainhas de *Apis mellifera* efetuadas no Apiário Experimental da UNEPE. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Época	Data
Época 1	09 de fevereiro de 2014
Época 2	15 de fevereiro de 2014
Época 3	22 de fevereiro de 2014
Época 4	01 de março de 2014
Época 5	08 de março de 2014
Época 6	15 de março de 2014

#### 4.3.4 Histologia

Para o processamento foi utilizado o mesêntero (ventrículo) (Figura 10) das rainhas virgens de *A. mellifera* que não foram levadas ao campo, e que foram alimentadas pelas operárias que entraram em contato com os agentes de controle estudados e respectivas testemunhas. O corpo das rainhas foi dissecado com o auxílio de pinças e alfinetes (Figura 10A) e em seguida retirada a amostra do mesêntero (Figura 10B)

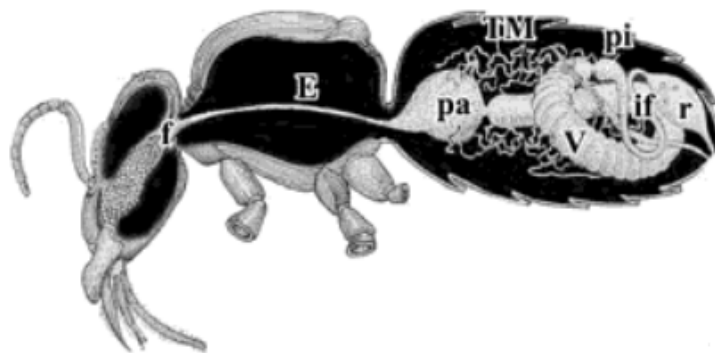


Figura 10: Representação esquemática de uma seção longitudinal de operária de scaptotrigona, mostrando o sistema digestório. F: faringe; E:esôfago; pa: papo; V:ventrículo; pi:piloro; if:intestino fino; r:reto; TM:túbulo de Malpighi. Fonte: CRUZ-LANDIM (2009)

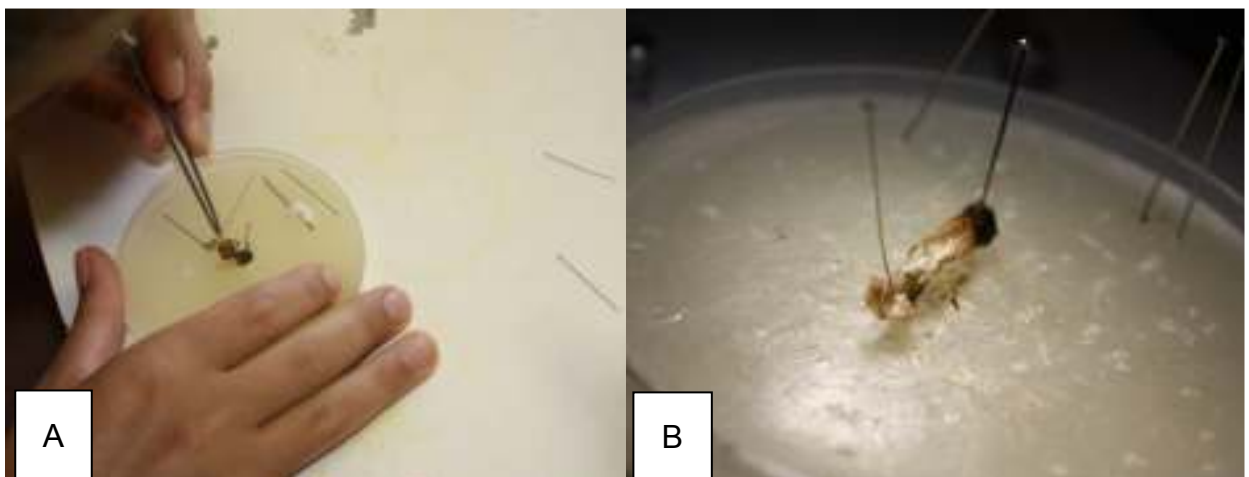


Figura 11 - Imagens da dissecção de Rainhas Virgens de *Apis mellifera*. A: utilizando pinças e alfinetes. B: Rainha dissecada.



As amostras de mesêntero 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 3h, lavadas em álcool 70% por 1 hora (Figura 12A). Foram realizadas mais duas lavagens em álcool 70% por 1 hora. Depois ficaram armazenadas em álcool 70% até o processamento (Figura 12B).

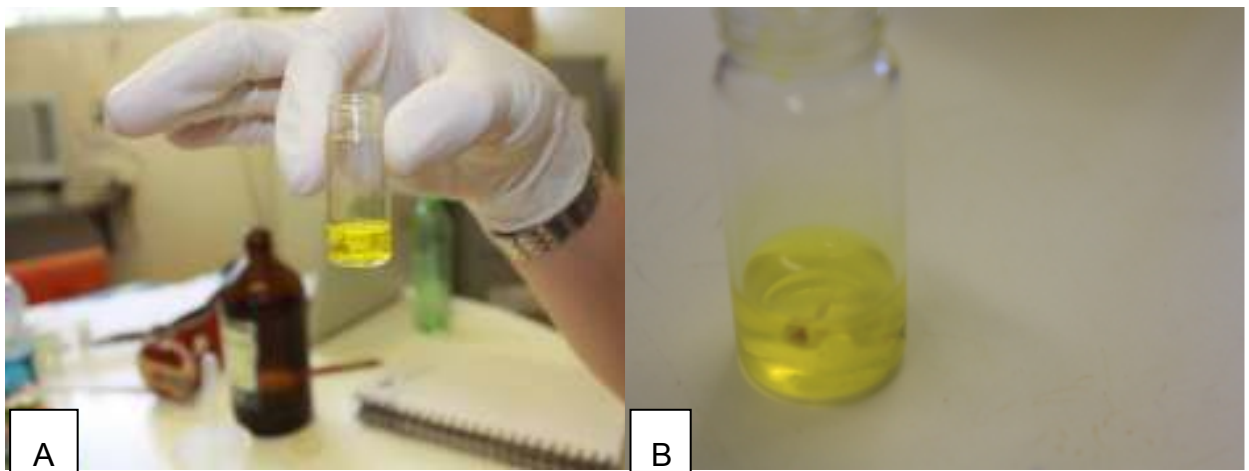


Figura 12 - A: Mesêntero da rainha de *Apis mellifera* fixado em *Bouin*. B: Mesêntero da rainha de *Apis mellifera* pronto para ser armazenado.

As amostras armazenadas em álcool 70% foram desidratadas por imersão em álcool de diferentes concentrações: (álcool 80%: 30 minutos, álcool 90%: 30 minutos, álcool 95%: 30 minutos, álcool 99%: 30 minutos, álcool 100% I: 20 minutos, álcool 100% II: 20 minutos), sendo posteriormente diafanizadas por imersão em xilol (xilol + álcool: 20 minutos; e Xilol II: 20 minutos), Na sequência foi realizada a parafinização (Xilol/Parafina Histológica 1:1: 120 minutos;) e o emblocamento em Parafina histológica (Parafina Histológica/cera de abelha 4:1).

O material emblocado foi cortado em Micrótomo rotativo manual, em cortes de 2 a 7  $\mu$ m de espessura, montados em lâmina de vidro de ponta fosca para microscopia (3,0x10,0 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 realizada a desparafinização (Xilol I: 10 minutos, Xilol II: 10 minutos) e a reidratação destes (álcool 100%: 5 minutos, álcool 95%: 5 minutos, álcool 70%: 10 minutos e depois lavagem em água destilada corrente: 2 minutos). Para a coloração, os cortes foram banhados em hematoxilina (4 minutos), lavados em água corrente (10 segundos), banhados em eosina (2 minutos) e novamente lavados em água destilada corrente (10 segundos). Estes ficaram em estufa a 35°C por dois dias, para que os corantes sequem, quando foram recobertos por lamínulas de vidro para microscopia (2,3 cmx3,6 cm) e fixados com Bálsamo do Canadá.

As lâminas contendo os cortes foram pré-selecionadas em Microscópio Biológico de luz Opton trinocular TNB-40T-PL, e as imagens capturadas com câmera digital DCM 310 (USB 2.0) 3M pixels, CMOS, utilizando o programa software Scope Tek minisee Version 1.1.3.0. Estas imagens foram arquivadas e depois mensuradas como o auxílio do programa ImageJ versão 1,48v.

Foram realizados testes quantitativos, comparando a altura das vilosidades do trato digestório das abelhas, comparando os tecidos das rainhas de *A. mellifera* que se alimentaram da geleia real produzida pelas operárias que entraram em contato com os agentes de controle testados e suas respectivas testemunhas, avaliando as possíveis alterações provocadas.

#### 4.3.5 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado no bioensaio, influência dos agentes de controle sobre produção de cria de *A. mellifera* foi o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e 10 repetições cada, sendo cada rainha considerada como unidade experimental. Foram utilizados os seguintes procedimentos: Bayesiano através do pacote Survival do Software R® (2013).

Para a análise das vilosidades do mesêntero, foram utilizados quatro tratamentos com 20 repetições cada e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, com 5% de significância no programa Assistat versão 7.7 beta (2015) (SILVA,1996; 2002; 2006; 2009).

#### 4.4 RESULTADOS

##### 4.4.1 Influência dos agentes de controle sobre a produção de cria de rainhas de *Apis mellifera*

A média da área de cria de operárias (cm<sup>2</sup>) das rainhas de *A. mellifera* foi de 235,2 cm<sup>2</sup> para as rainhas que entraram em contato com *B. bassiana*, 297,7cm<sup>2</sup> para Água + Tween<sup>®</sup> e 217,9 cm<sup>2</sup> para o extrato de romã (Tabela 9), sendo que os mesmos não diferiram entre si.

O tratamento Água Destilada foi colocado a campo junto com os demais tratamentos, mas com o decorrer do tempo, este tratamento não pode ser avaliado por não ter obtido a aceitação das rainhas.

**Tabela 9 - Médias dos tratamentos (Média±DP) de rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Área de cria (cm <sup>2</sup> )
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	297,7±8,96 a
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	217,9±8,83 a
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	235,2±8,78 a
Testemunha (Água Destilada)	0,00±0,00

<sup>a</sup>Letras distintas, indicam diferenças significativas entre médias de tratamentos, por meio do contrastes Bayesianos em nível de 95% de credibilidade.

#### 4.4.2 Histologia

A altura das vilosidades do mesêntero das rainhas de *A. mellifera* não foi reduzida pela presença do tratamento Boveril<sup>®</sup> (*B. bassiana*) e nem pela presença do tratamento com extrato de romã (*P. granatum*), quando comparados às testemunhas. Observou-se 119,10 µm para altura do mesentêro das rainhas provenientes do tratamento com Boveril<sup>®</sup>, 126,22 µm para testemunha (Água e Tween<sup>®</sup>), 131,82 µm para testemunha (Água Destilada) e 141,82 extrato de romã (*P. granatum*) (Tabela 10).

**Tabela 10 - Altura (µm) das vilosidades do mesêntero das rainhas de *Apis mellifera* após serem alimentadas por operárias que entraram em contato com agentes de controle. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2015.**

Tratamento	Altura das vilosidades(µm)
Testemunha (Água e Tween <sup>®</sup> )	126,22 ± 5,93 ab
Testemunha (Água Destilada)	131,83 ± 5,60 ab
Extrato de Romã ( <i>P. granatum</i> )	141,82 ± 6,36 b
Boveril <sup>®</sup> ( <i>B. bassiana</i> )	119,10 ± 5,55 a
P	0,0536

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

#### 4.5 DISCUSSÃO

Xavier (2009) descreve que os inseticidas botânicos com ação mais rápida levam mais de algumas horas para exercerem sua atividade tóxica sobre os adultos das abelhas. Isto indica que as abelhas ao visitarem lavouras com resíduos de inseticidas botânicos transportariam no seu corpo, no néctar e no pólen, resíduos

destes produtos para as colmeias e estes poderiam exercer ação tóxica sobre suas crias. Diferente do que aconteceu com o extrato de romã (*P. granatum*), o qual não provocou efeito negativo na área de cria, quando as operárias entraram em contato com o substrato contaminado e na sequência alimentaram as rainhas. Além disso, as vilosidades do mesêntero também não foram afetadas pela ação deste extrato.

Ao testar extratos vegetais de manjerona, chapéu de couro, romã e camomila na dieta de *A. mellifera* e pulverizar em superfícies que as abelhas entravam em contato, foram avaliados a sobrevivência de *A. mellifera*, a série de tempo de uma a 240 horas. Os extratos vegetais de manjerona e romã reduziram a sobrevivência das operárias e causaram modificações morfológicas, diminuindo o comprimento de células do mesêntero (SILVA 2014)

Conídios de *B. bassiana* em colmeias de *A. mellifera* provocaram baixa mortalidade nestas abelhas e nenhum efeito perceptível sobre características de comportamento, larvas e colônias (ALVES et al., 1996).

Com o objetivo de avaliar parâmetros como peso total das abelhas adultas, área de cria e área de mel, foram testados dois isolados de *B. bassiana*, GHA e BB05002 em ácaros varroa (*V. destructor*). Como resultado para o ácaro temos efeito positivo, demonstrando uma maior proporção de ácaros mortos que a testemunha. Entretanto, não houve diferença para os parâmetros peso total, área de cria e produção de mel das abelhas *A. mellifera* (MEIKLE et al., 2008).

De Souza (2009) concluiu na sua dissertação que colônias com rainhas com maior peso, acima de 200 mg, fecundadas naturalmente, apresentaram melhor desempenho que as rainhas leves, apresentando médias superiores para área de postura de ovos e área de cria fechada. No trabalho executado, o maior peso ao à emergência foi verificado no tratamento Boveril® (*B. bassiana*) (223,63 mg), mas ao analisar a área de cria não houve diferenças entre os tratamentos, reforçando a hipótese que os agentes de controle testados não interferiram no desempenho das rainhas de *A. mellifera*.

Todos os autores referenciados citam a importância de escolha da rainha através de parâmetros quantitativos como peso à emergência, mostrando que

rainhas mais pesadas apresentam menor tempo de expansão populacional, maior viabilidade da cria, área de postura e de cria fechada superior e otimização da atividade do vôo nupcial, aspectos importantes para garantir colmeias com alta população, necessária para garantir a funcionalidade destas colmeias. Neste trabalho ao avaliar a área de cria com rainhas de *A. mellifera* que entraram em contato com agentes de controle testados, não houve diferenças entre os tratamentos testados, sendo que a área de cria variou de 217,9 cm<sup>2</sup> para o tratamento com extrato de romã (*P. granatum*) e 297,7 cm<sup>2</sup> para o tratamento Testemunha (Água e Tween<sup>®</sup>) Estes valores são difíceis de serem comparados, pela escassez de trabalhos abordando a ação destes agentes diretamente sobre as rainhas.

No presente trabalho os agentes de controle não afetaram a altura das vilosidades do mesêntero de rainhas de *A. mellifera* quando comparados às respectivas testemunhas. Sendo que o maior valor encontrado para as vilosidades foi de rainhas que entraram em contato com operárias expostas ao do tratamento extrato de romã (*P. granatum*) 141,82µm. Sabemos que estas células são frequentemente renovadas devido ao desgaste que podem ocorrer devido a intensa atividade secretora e absorptiva e que podem ser alterados quando ocorre absorção de determinados produtos. São estruturas importantes que contribuem no aumento da superfície de troca, responsáveis pelo aumento da superfície de absorção celular. onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos da digestão Mas não existem dados na literatura sobre o estudo do comprimento de vilosidades do mesêntero de rainhas de *A. mellifera* sob a ação de agentes de controle. Alguns trabalhos foram realizados com base na ação de produtos químicos.

Oliveira (2012) verificou que a ingestão de doses subletais de thiamethoxam causa alterações morfológicas e histoquímicas no ventrículo de operárias de *A. mellifera*, afetando as células digestivas e células regenerativas presentes neste epitélio. Também aponta que o thiamethoxam é tóxico para operárias recém emergidas de *A. mellifera* africanizada baseada no período de exposição das

abelhas ao thiamethoxam por 1, 3, 5 e 8 dias após o início do fornecimento do alimento contaminado.

Rossi (2012) testou danos ao ventrículo de operárias de *A. mellifera* africanizada, e através dos resultados obtidos, constatou que o imidaclopride é citotóxico para as células digestivas do ventrículo das abelhas, sendo que o aumento tanto da liberação de secreção apócrina quanto de células no lúmen, podem ser mecanismos compensatórios no ventrículo. Ocorreram alterações morfológicas e histoquímicas nas células digestivas expostas a este inseticida que podem desencadear alterações e afetar a saúde das abelhas e da colônia e comprometer a viabilidade.

O ventrículo é a região do mesêntero onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos da digestão. É um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco, no interior da cavidade abdominal, apresenta invaginações que contribuem no aumento da superfície de troca e microvilosidades responsáveis pelo aumento da superfície de absorção celular (CRUZ-LANDIM, 2009). A altura dessas invaginações podem sofrer modificações devido a desgastes provocados pela intensa atividade absorptiva, como de produtos tóxicos, o que não ocorreu nos tratamentos avaliados, demonstrando que os agentes de controle não provocaram alterações nas rainhas alimentadas por operárias que entraram em contato com os agentes de controle.

#### 4.6 CONCLUSÃO

Os agentes de controle (extrato de romã e *B. bassiana*) não interferiram na qualidade da rainha, pois não houve efeitos diretos sobre a área de cria.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

AL-TIKRITY, W.S.; HILLMANN, R.C.; BENTON, A.W.; CLARKE JR., W.W.; A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. AM. BEE J. III 20-26. 1971.

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

ARBOITTE, M.Z.; CASTAGNINO, G.L.; LENGLER S.; GARCIA G.G.; DE MENEZES, L.F.G.; Desenvolvimento de núcleos de *Apis mellifera* alimentados com suplemento aminoácido vitamínico, Promotor L®. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, 2006.

BIESMEIJER, J. C.; SLAA, E. J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**. n. 37, p. 240-258, 2006.

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

COITINHO, R.L.B.C.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, A.G.; Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.172-178, 2011.

COSTA-MAIA, F. Aspectos genéticos da produção de mel e comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* africanizadas. 81 f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - UEM - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2009.

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

DE SOUZA, D.A.; Aspectos reprodutivos de rainhas africanizadas (*Apis mellifera*L.): influência do peso ao nascer no desempenho das colônias. Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/**USP**. 2009.

DOOLITTLE, G.M. Scientific Queen-Rearing as practically applied. **Chicago**.163p. 1889.

FAQUINELLO, P., TOLEDO, V. A. A., MARTINS, E. N., OLIVEIRA, C. A. L., SEREIA, M. J, COSTA- MAIA , F. M., RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees. **Sociobiology**, v. 57, n 03. P. 495-509. 2011.

GILLEY, D. C., Tarpy, D. R. & Land, B. B. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Behavioral Ecology Sociobiology** 55, 190-196. 2003.

GULLAN, P.J.; CRANSTON P.S.; Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo: **Roca**, 480p. 2009.

HALAK, A.L.; Parâmetros e correlações genéticas e fenotípicas para peso e medidas morfométricas em rainhas *Apis mellifera* africanizadas. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. UEM. Maringá.46f. 2012.

HATCH, S., TARPY, D. R., FLETCHER, D. J. C. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. **Insectes Sociaux**, v.46, n.4, p.372-377. 1999.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. 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.

MARTINEZ, S. O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: **IAPAR**, 2002.



MEIKLE, W.G.; MERCADIER, G.; ANNAS, F.; HOLST, N.; Effects of multiple applications of a *Beauveria* based biopesticide on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) densities in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of apicultural Research an Bee World**. 48(3). 2009.

OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J.; MARQUES, A.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.

OLIVEIRA, R.A.; Análises morfológica e histoquímicas dos ventrículos e do cérebro de operárias recém emergidas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) tratadas com *Thiamethoxam*. **Trabalho de conclusão de curso – Universidade Estadual Paulista**, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro – SP. 79p. 2012.

PENTEADO, S. R.; Defensivos alternativos e Naturais. **Editora Via Orgânica** Campinas – SP. 176p. 2010.

PINHEIRO, P.V.; QUINTELA, E.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: 95 Embrapa**, Santo Antônio de Goiás – GO. p.1-4. 2004.

RICKETTS, T. H., J. REGETZ, I. STEFFAN-DEWENTER, S. A. CUNNINGHAM, C. KREMEN, A. BOGDANSKI, B. GEMMILL-HERREN, S. S. GREENLEAF, A. M. KLEIN, AND M. M. MAYFIELD. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**.11:499-515. 2008.

ROSSI, C.A..Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista**, Instituto de Biociências de Rio Claro Rio Claro – SP. 101F. 2011.

SANTOS, J.J.; MESSAGE, D. Utilização de mini-recrias para a produção de geléia real. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5, 1980. Viçosa. Anais... **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, p. 307-311. 1980.

SILVA, F. de A.S.E.The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: **American Society of Agricultural Engineers**, p.294-298.1996.

SILVA, F. de A. S. E. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programacomputacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p71-78. 2002.

SILVA, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version ofThe Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. p.393-396. 2006.

SILVA, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de.Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, E. D. Efeito de produtos alternativos sobre *Bacillus thuringiensis Subesp. Kurstaki* e *Trichogramma pretiosum riley* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Doctoral dissertation, **Tese.de Doutorado** Londrina: Universidade Estadual de Londrina). 2010.

SILVA, R.T.L.S. Efeito de micro-organismos entomopatogênicos e extratos vegetais sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos – Pr.** 109 p. 2014.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologia de Atividade Antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**. 124-128p. 2009.

TARPY, D. R., HATCH, S., FLETCHER, J. C.The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **Animal Behaviour**., v.59, n.1, 97-101. 2000.

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

XAVIER, V. M.. Impacto de Inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae). 2009. 43f. **Dissertação (Mestrado em Entomologia)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados propiciam maior conhecimento para compreender as interações nos ecossistemas nos quais as abelhas se encontram.

Os agentes de controle testados não interferiram nas rainhas de *Apis mellifera*. Mesmo assim, novos estudos, com outros agentes de controle utilizados e com diferentes métodos de avaliação fazem-se necessários.

Outros fatores podem também interagir e muitos ainda estão pouco elucidados, sendo necessários novos estudos com o intuito de aumentar a gama de informações sobre estes e outros produtos que possam ser utilizados sem causar alterações nas abelhas.

Apêndice 1 – Relação de rainhas de *A. mellifera* implantadas nos núcleos de fecundação. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2015.

Tratamento	Identificação Rainha	Colônia
Fungo	19V	7000-A
Fungo	22V	UTFPR13
Fungo	24V	UTFPR9
Fungo	25V	NS06B
Fungo	27V	NS02
Extrato	30V	UTFPR1
Extrato	40V	UTPR14
Extrato	47V	840D
Extrato	54V	NS03C
Extato	55V	NS06A
AD	29V	803C
AD	20V	830-A
AD	33V	LAB.MONT.
AD	35V	840I
AD	42V	UTPFR10
AT	38V	UTFPR16
AT	44V	RECEPTORA 1
AT	45V	UTFPR17
AT	34V	840F1
AT	37V	UTFPR15