UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Efeito tóxico de *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae) para as abelhas *Apis mellifera*,
Tetragonisca angustula, *Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae)**

Versão corrigida

Izabel Christina da Silva

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de (Doutor) em
Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

IZABEL CHRISTINA DA SILVA

**Efeito tóxico de *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae) para as abelhas *Apis mellifera*,
Tetragonisca angustula, *Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae)**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de (Doutor) em
Ciências, Área: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Izabel Christina da

Efeito tóxico de *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae) para as abelhas *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae). Ribeirão Preto, 2012.

101 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Entomologia.

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea.

1. *Apis mellifera*. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Barbatimão.

*Dedico este trabalho àqueles
que me apoiaram e incentivaram
“Dejair, Augustho e Deborah”.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ *Ao Professor Espencer pela orientação, confiança e incentivo.*
- ❖ *Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.*
- ❖ *Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia da USP – Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de doutorado.*
- ❖ *Ao Prof. Dr. Dejair Message pelos ensinamentos e contribuição para a minha formação.*
- ❖ *Aos Professores e Doutores David, Zilá, Weyder e Karina pela importante participação nesta banca.*
- ❖ *Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes e à aluna de doutorado Tatiani Mesquita Bondancia, do Laboratório de Produtos Naturais - Departamento de Química da UFSCAR, pela disponibilidade em me auxiliar preparando os extratos de barbatimão.*
- ❖ *A Dra. Claudia Cristina Paro de Paz, Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA), pela valiosa ajuda com as análises estatísticas.*
- ❖ *Aos apicultores Edmar e Getúlio pela intensa colaboração cedendo colônias e os apiários para realização dessa pesquisa e pelo interesse em relação à sanidade das abelhas.*

❖ Ao Sr. Pedro de Assis Caetano pelo grande apoio e ajuda durante a realização de todos os experimentos. Agradecer é um gesto pequeno em relação a todo incentivo, conselhos e ensinamentos durante nossas viagens aos apiários. Saiba que minha trajetória foi enriquecida pela sua presença!

❖ Ao Jairo pela ajuda nas coletas e dedicação aos melíponíneos

❖ À Marcela pela paciência nas inseminações das rainhas.

❖ Aos amigos Ivan Castro e Mauro Prato pela ajuda e por terem me ensinado a técnica de criação de melíponíneos.

❖ À diretoria e aos funcionários da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA - Pólo Regional do Vale do Paraíba, Pindamonhangaba, São Paulo) por colocar a disposição o laboratório onde alguns experimentos foram desenvolvidos e pelo importante auxílio.

❖ Aqueles aqui não mencionados e que contribuíram de maneira marcante para execução dessa pesquisa, saibam que sou muito grata a vocês.

..."Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe dará confiança diante de qualquer obstáculo".

Chico Xavier

RESUMO

SILVA, I. C. **Efeito tóxico de *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae) para as abelhas *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae).** 2012. 101 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

No Brasil, estudos realizados sobre o pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) mostraram um efeito tóxico quando incorporado em dietas oferecidas para larvas de abelhas africanizadas. Esse pólen é o agente causador da Cria Ensacada Brasileira (CEB), caracterizada por mortalidade de pré-pupas. Doenças em *Apis mellifera* tem sido amplamente estudadas. Entretanto, há poucos relatos sobre a sua ocorrência em abelhas sem ferrão. Portanto, este trabalho teve por objetivos gerais: avaliar se abelhas africanizadas apresentam diferenças na sobrevivência, na quantidade de pólen de barbatimão coletado e se existem diferenças na coleta desse pólen entre as colônias de apiários diferentes; verificar se as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona testaceicornis* coletam esse pólen e se ele causa mortalidade de crias; subsequentemente realizar a criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* para avaliar a toxicidade desse pólen para as crias. Para isso, colônias de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* foram transportadas para apiários localizados em Altinópolis/SP, durante o período de florescimento do barbatimão (outubro a dezembro). Nas colônias de abelhas africanizadas foi coletado o pólen do favo e avaliado a sobrevivência das crias com idade controlada. Nas abelhas sem ferrão foi coletado o pólen da corbícula e do interior das colméias. As amostras de pólen foram preparadas pelo método padrão europeu, sendo contados 300 grãos de pólen em três lâminas diferentes para verificar a porcentagem de grãos de pólen de barbatimão. As abelhas africanizadas apresentam diferenças na coleta de pólen dentro e entre apiários; apenas três colônias não coletaram e uma coletou pouco pólen de barbatimão, entre 92 colônias analisadas. As crias dessas colônias não apresentaram sintomas da CEB. As rainhas filhas dessas colônias foram inseminadas instrumentalmente e fecundadas naturalmente. As colônias contendo essas rainhas foram analisadas em 2011 juntamente com as matrizes; houve diferenças na sobrevivências, dependendo da localização do apiário. Foram encontradas diferenças na preferência de coleta do pólen de barbatimão. Os resultados obtidos poderão contribuir para que novas pesquisas sejam realizadas com o objetivo de compreender o mecanismo de baixa preferência para a coleta do pólen e para que programas de seleção sejam realizados visando reduzir os problemas causados por este pólen tóxico. Nas abelhas sem ferrão encontramos o pólen de barbatimão nos potes de alimento e nas corbículas. Algumas crias mortas foram encontradas nas células dos favos durante o mesmo período em que foi observado a mortalidade em abelhas africanizadas com sintomas da CEB. Os resultados sugerem que a mortalidade observada pode ser devida ao consumo desse pólen. As larvas das abelhas sem ferrão foram criadas *in vitro* e alimentadas com o alimento larval contendo diferentes quantidades de pólen de barbatimão. A sobrevivência de *S. aff. depilis* e *N. testaceicornis* não foi afetada quando ingeriram o alimento contendo o pólen de barbatimão, porém para *T. angustula* a sobrevivência foi significativamente maior quando as larvas receberam apenas o alimento larval (controle) em comparação com aquelas alimentadas com o alimento contendo 1% do pólen de barbatimão. As larvas de *A. mellifera* também foram criadas *in vitro* e alimentadas com dietas contendo 1, 2 e 3% do pólen de barbatimão. Todas as larvas alimentadas com o pólen de barbatimão morreram com os sintomas semelhantes aos observados em condições naturais. De acordo com os resultados obtidos concluímos que essas abelhas sem ferrão são fisiologicamente mais resistentes a este pólen tóxico.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, abelhas sem ferrão, barbatimão

ABSTRACT

SILVA, I. C. **Toxic effect of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae) for the bees *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona aff. depilis* and *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae).** .2012. 101 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In Brazil, studies conducted on the *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) pollen have shown its toxic effect when it is incorporated into diets offered to Africanized bees larvae. This pollen is the causative agent of Brazilian Sac Brood (BSB), characterized by pre-pupae mortality. Diseases in *Apis mellifera* have been extensively studied. However, there are a few reports on their occurrence in stingless bees. Thus, the main objective of this work was to evaluate whether Africanized bees present differences in survival, amount of barbatimão pollen collected and whether there are differences in the collections of this pollen between colonies of different apiaries; to verify whether *Scaptotrigona aff. depilis*, *Tetragonisca angustula* and *Nannotrigona testaceicornis* bees collect this pollen and whether it leads to brood mortality; and subsequently to evaluate the toxicity of this pollen to bees brood by rearing *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* and *N. testaceicornis* larvae *in vitro*. For this *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* and *N. testaceicornis* colonies were taken to apiaries located in Altinópolis/SP, during barbatimão flowering period (October to December). In the Africanized bee colonies pollen was collected from the comb and the survival of the brood with controlled age was evaluated. In the stingless bee colonies pollen was collected from the corbicula of the bees and also from the interior of the hive. The pollen samples were prepared by the standard European method, counting 300 pollen grains in three different slides to check the percentage of barbatimão pollen grains. Africanized bees presented differences in pollen collections within and among apiaries; only three colonies did not collect and one collected little barbatimão pollen, among 92 colonies analyzed. The brood of these colonies did not present symptoms of BSB. The daughter queens of these colonies were instrumentally inseminated or naturally fecundated. These colonies were analyzed in 2011, together with their parental colonies; there were differences in survival depending on the apiary location. We found differences in the collection preference of barbatimão pollen. These results will contribute to the planning of new studies with the aim of understanding the low preference mechanism for pollen collection and selection programs aimed at reducing problems with this toxic pollen. In the stingless bees, we found barbatimão pollen in the food pots and in the corbiculae. Some dead brood was found in the brood cells, during the same period in which mortality was observed in Africanized bees with BSB symptoms. The results suggest that the mortality observed may be due to the consumption of this pollen. Larvae of stingless bees were reared *in vitro* and fed larval food containing different amounts of barbatimão pollen. The survival of *S. aff. depilis* and *N. testaceicornis* was not affected when ingesting food containing barbatimão pollen, but survival of *T. angustula* was significantly higher when the larvae received only larval food (control) compared to those fed larval food containing 1% barbatimão pollen. The larvae of *A. mellifera* were also reared *in vitro* and fed diets containing 1, 2 and 3% barbatimão pollen. All larvae fed barbatimão pollen died with symptoms similar to the ones observed under natural conditions. We conclude that these stingless bees are physiologically more resistant to this toxic pollen.

Keywords: *Apis mellifera*, stingless bees, barbatimão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	9
Capítulo 1: Avaliação de mecanismos de defesa de abelhas <i>Apis mellifera</i> (africanizadas) aos efeitos tóxicos de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i>	10
INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÃO.....	33
Capítulo 2: Coleta de pólen de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> (Fabaceae) por meliponíneos e seu efeito nas crias.....	39
INTRODUÇÃO.....	40
OBJETIVOS.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO.....	54
Capítulo 3: Bioensaios para avaliar a toxicidade de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> em <i>Apis mellifera</i>, <i>Scaptotrigona aff. depilis</i>, <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i>.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
OBJETIVOS.....	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÕES GERAIS.....	92
REFERÊNCIAS.....	94

1 – INTRODUÇÃO GERAL

Muitas plantas de interesse econômico dependem da atuação dos insetos, sem os quais não ocorre a polinização e, conseqüentemente, a produção de frutos e sementes (COUTO; COUTO, 2002). Devido às adaptações corporais e a frequência com que visitam as flores as abelhas são os polinizadores mais efetivos de várias culturas e plantas nativas não polinizadas pelo vento (BATRA, 1995). As abelhas e as plantas apresentam uma estreita relação de dependência, onde as plantas fornecem alimentos (néctar e pólen) para as abelhas e em troca recebem os benefícios da transferência do pólen (KEVAN; BAKER, 1983; PROCTOR *et al.*, 1996). Segundo Locatelli (2010), as abelhas são consideradas polinizadores importantes, possuindo mecanismos apropriados para o transporte dos grãos de pólen e executando um serviço extremamente importante tanto para as plantas que dependem da polinização cruzada quanto para aquelas não dependem, pois melhoram a quantidade e o número de grãos e sementes originando plantas mais vigorosas e produtivas.

De acordo com Sadeh *et al.* (2007), o valor econômico da polinização por insetos para a agricultura pode ser estimado com base na abundância e no valor de mercado das culturas que são polinizadas. Estima-se que nos Estados Unidos, por exemplo, as abelhas *Apis mellifera* sejam responsáveis por um incremento da ordem de 14,6 bilhões de dólares/ano na produção de alimentos através da polinização de culturas de interesse econômico (MORSE; CALDERONE, 2000; STOKSTAD, 2007). Devido à disponibilidade de um número elevado de colônias de *A. mellifera*, ao tamanho dos enxames e por polinizarem inúmeras culturas de importância econômica, elas são utilizadas para a polinização de cultivos comerciais em todo o mundo (BENEDEK; GALL, 1972). Segundo Genersch (2010), as abelhas *A. mellifera* são um dos mais importantes polinizadores de culturas que dependem de agentes polinizadores e contribuem com aproximadamente 35% da produção global de alimentos. Entretanto, segundo Message *et al.* (2010), perdas significativas dessas abelhas estão ocorrendo em várias partes

do mundo; devido a severidade e desconhecimento da causa a síndrome foi chamada de CCD (Colony Collapse Disorder), a qual apresenta como principal característica a perda rápida das abelhas operárias (vanENGELSDORP *et al.* 2009). De acordo com Message *et al.* (2010), o primeiro relato ocorreu em novembro de 2006 nos Estados Unidos onde se reportou perdas anuais da ordem de 30%, preocupando a indústria de polinização americana; acredita-se que várias condições possam estar associadas causando tal fenômeno, os resultados mais recentes apontam para altas taxas de infecção por diferentes agentes microbianos, em especial viroses e a *Nosema ceranae*. No Brasil, Message *et al.* (2010) relataram a ocorrência de CCD em colônias de abelhas africanizadas. Devido a CCD houve um aumento na busca da criação em escala de outros polinizadores de culturas agrícolas.

Slaa *et al.* (2006) apresentaram informações detalhadas sobre o papel das abelhas sem ferrão na polinização de diferentes culturas agrícolas. Várias pesquisas tem mostrado que diversos meliponíneos conhecidos popularmente como abelhas sem ferrão são polinizadores efetivos em ambientes fechados e podem, portanto, ser uma alternativa valiosa para a polinização comercial de diversas culturas (CRUZ, 2009). De acordo com Nogueira-Neto (1970), *Tetragonisca angustula* conhecida popularmente como jataí é a abelha que apresenta maior potencial como agente polinizador de flores não polinizadas por *A. mellifera*. Segundo Malagodi-Braga e Kleinert (2004), a jataí é eficiente na polinização do morangueiro em estufas, produzindo frutos mais pesados, em maior quantidade e com desenvolvimento perfeito. A *Nannotrigona testaceicornis* conhecida popularmente como iraiá, também é utilizada em estufas para cultivo de morangueiro (IMPERATIZ-FONSECA *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2008) verificaram maior produção de pepinos em casas de vegetação utilizando as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis* e *N. testaceicornis* como polinizadores.

Apesar da grande importância desses insetos, como polinizadores de diversas espécies vegetais, muitas plantas que atraem seus agentes polinizadores necessitam se protegerem da

herbivoria e produzem compostos tóxicos que podem afetar tanto os herbívoros quanto os polinizadores (ROTHER *et al.* 2009). As abelhas podem ser afetadas ao visitarem essas plantas, pois pode ocorrer a produção de compostos tóxicos depositados em seu pólen, néctar floral, néctar extrafloral e, também, nas secreções de homópteros (ALVES, 2010a). As abelhas necessitam coletar pólen e néctar, durante todo o ano, para alimentar suas crias e para sua própria alimentação. Devido ao fato do pólen ser a principal fonte de proteínas para as abelhas, principalmente na fase larval (MICHENER, 1974), ele pode oferecer riscos às colônias de abelhas que forrageiam flores contendo pólen tóxico. Após ser coletado pelas abelhas campeiras o pólen é transportado para a colmeia onde é armazenado e utilizado na alimentação das larvas, sendo indispensável para o seu desenvolvimento. Segundo Brodsgaard (2003), as larvas das abelhas são mais sensíveis do que os adultos porque necessitam de uma dieta complexa para o seu desenvolvimento e não escolhem o próprio alimento, pois recebem alimentação que é fornecida pelas operárias nutrizes. Os impactos causados pela coleta de substâncias que podem ser tóxicas para as crias das abelhas tem grande importância, pois o aumento da mortalidade de imaturos consequentemente leva a diminuição da colônia, ocasionando uma diminuição na atividade de polinização (VAN DER STEEN, 2001).

Cintra; Malaspina e Bueno (2005) publicaram uma revisão referente ao estudo das plantas tóxicas para abelhas, na qual estão relacionados os mais importantes artigos sobre o assunto, principalmente os de autores brasileiros; sendo citadas como sendo tóxicas para as abelhas as seguintes plantas: *Sphatodea campanulata* (espatodea), *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* (barbatimão) e *Dimorphandra mollis* (faveiro). Del-Lama e Peruquetti (2006) relataram a mortalidade de 20 espécies de abelhas ao visitarem as inflorescências de *Caesalpinia peltophoroides* (sibipiruna) e relacionaram a mortalidade à presença de um composto tóxico no néctar. Mesquita *et al.* (2010) estudaram a toxicidade do

pólen de três plantas (*Azadirachta indica*, *Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea*) que são visitadas por *A. mellifera* na região semi-árida do Brasil. Eles observaram que o pólen de *P. stipulacea* reduziu significativamente a sobrevivência das abelhas, enquanto que o pólen de *A. indica* apresentou toxicidade reduzida e de *M. tenuiflora* não apresentou toxicidade para as abelhas. Segundo Alves (2010a), algumas espécies podem apresentar pólen tóxico para *A. mellifera*, porém sem grandes preocupações para a apicultura, mas há as que causam grandes prejuízos, como é o caso do barbatimão (*Stryphnodendron* spp).

Apesar de várias pesquisas mostrarem a toxicidade do barbatimão para as abelhas e da enorme perda de colônias que ocorre todo ano, principalmente na região sudeste, devido à presença dessas árvores próximas a muitos apiários, não há nenhum estudo revelando se as abelhas africanizadas possuem algum mecanismo de defesa quando expostas a esse pólen.

Devido à importante função desempenhada pelas abelhas como polinizadores de uma grande variedade de culturas e pela produção de mel, pólen e de outros produtos, torna-se necessário realizar pesquisas sobre a sua sanidade, visando à preservação desse importante grupo de insetos.

Diante do exposto o primeiro capítulo da presente tese aborda sobre a possibilidade das abelhas africanizadas possuírem algum mecanismo de defesa aos efeitos do pólen de *S. polyphyllum*.

O segundo capítulo aborda se outros importantes polinizadores como as abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* coletam o pólen de *S. polyphyllum* e qual é o seu efeito nas crias.

O terceiro capítulo é sobre a criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* visando avaliar a toxicidade de *S. polyphyllum* para as crias dessas abelhas.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* foi descrito por Martius em 1837, a partir de três espécies coletadas no Brasil: *S. barbadetimam*, *S. polyphyllum* e *S. rotundifolium* (SCALON, 2007). As espécies pertencentes a esse gênero são conhecidas popularmente como barbatimão, sendo a palavra *Stryphnodendron* originada do grego, cujo significado *Strypnós* (duro) e *déndron* (árvore) dá idéia de lenho duro; por sua vez, a palavra *barbadetiman* é um termo específico de origem indígena (ibá-timo) que significa “árvore que aperta”, isto é, adstringente (PANIZZA *et al.*, 1988).

Conforme Occhioni (1990), nesse gênero são encontradas tanto espécies anãs com cerca de 50 cm de altura, quanto grandes árvores com 35 a 40m. Elas apresentam inflorescências com número variável de flores pequenas, dispostas em espigas densas, axilares, medindo cerca de 10 cm de comprimento e os frutos são do tipo vagem, contendo várias sementes de coloração castanho-clara e ligeiramente achatadas (LORENZI, 1992). De acordo com Felfili *et al.* (1999), as flores são, na maioria das vezes, hermafroditas com longevidade de apenas um dia e produzem pequenas quantidades de néctar atraindo insetos como: *Apis mellifera*, *Bombus* spp., moscas Tabanidae e, especialmente, abelhas Meliponini como principais polinizadores.

Segundo Scalon (2007), esse gênero apresenta distribuição neotropical, com limite norte de ocorrência a Nicarágua e como limite sul o Estado do Paraná, no Brasil. De acordo com a mesma autora, *Stryphnodendron* reúne 36 táxons dos quais cerca de 89% são encontrados no Brasil e, aproximadamente, 50% são exclusivos do território brasileiro; ocorrendo em diversos tipos de vegetação, principalmente no Cerrado e na Amazônia. Santos *et al.* (2002) e Jacobson *et al.* (2005) mostraram que entre as espécies de barbatimão, *S. polyphyllum* possui maior produção de fenóis totais e taninos, especialmente em solos de

baixa fertilidade e com elevada saturação de alumínio. Sanches *et al.* (2007) fizeram uma comparação morfológica das folhas de três espécies de barbatimão (*S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*), as quais mostraram diferenças morfológicas quanto ao tamanho, coloração e pubescência, sendo: as folhas de *S. adstringens* de maior tamanho, glabras e concolores; já as folhas de *S. polyphyllum* são menores, pubescentes e discolores; enquanto que as folhas de *S. obovatum* são de tamanhos semelhantes ao *S. polyphyllum*, porém glabras e discolores.

Importância econômica do gênero

Esse gênero apresenta elevada importância econômica no Brasil, especialmente pelas suas características medicinais. A casca contém cerca de 20 a 30% de taninos (SANTOS *et al.*, 2002), que possuem atividades medicinais diversas, como anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, anti-diarréica, antiinflamatória e cicatrizante (JACOBSON *et al.*, 2005). Segundo Almeida e Sano (1998), a casca é bastante utilizada para curtume de couros e peles. De acordo com Lorenzi e Matos (2002), um medicamento preparado com a casca do barbatimão tem sido usado com sucesso para prevenir queimaduras resultantes da radioterapia.

Herzog-Soares *et al.* (2002) relataram que a utilização dos extratos de *Stryphnodendron* podem ser novas alternativas no controle de parasitoses, tornando-se relevante principalmente na doença de Chagas. Outra grande importância, segundo Paula (2009), é que o extrato apresenta neutralização das atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta* (surucucu), incluindo as atividades hemorrágica, coagulante, hemolítica e proteolítica, devido a isto pode ser utilizado em conjunto com os antisoros para aumentar a eficiência da neutralização dos efeitos do veneno.

Toxicidade do *Stryphnodendron*

Tokarnia *et al.* (2000) definem plantas tóxicas de interesse pecuário aquelas que, ingeridas espontaneamente, podem causar danos a saúde ou mesmo a morte dos animais. Estas plantas afetam sistemas ou órgãos específicos causando, dependendo de cada planta, sinais clínicos e patológicos também específicos.

No Brasil, segundo Riet-Correa (2007), *S. coriaceum* e *S. obovatum* são considerados abortivos para ruminante; as intoxicações causam aborto, sinais digestivos e fotossensibilização em bovinos. Em caprinos foi descrita uma forma nervosa da intoxicação experimental por *S. coriaceum* (BRITO *et al.*, 1995). Tokarnia *et al.* (1998) realizaram experimentos com vacas administrando favas de *S. obovatum* com doses de 5 g/kg/dia durante períodos de 9 a 26 dias e observaram a presença de aborto ou morte fetal com mumificação. Segundo históricos de criadores de bovinos, os animais apreciam os frutos de *S. obovatum* e alguns até ficam viciados em comê-los, não engordam, muitos até emagrecem, ficam debilitados e acabam abortando (BRITO *et al.*, 2001).

O extrato aquoso de *S. obovatum*, utilizado na dieta de *Drosophila melanogaster*, causou efeito inibitório no ciclo de vida e diminuição do número de imagos, com o aumento da concentração desse extrato na dieta (RODRIGUES, 1982). Rebecca *et al.* (2002) estudaram a toxicidade do extrato aquoso total de barbatimão, após administração oral em camundongos, sendo que os resultados indicaram efeitos tóxicos nos animais experimentais.

Toxicidade para as abelhas

O barbatimão é citado por diferentes autores devido a sua toxicidade para as abelhas africanizadas. Alves *et al.* (1996) realizaram estudos sobre o efeito do extrato aquoso da inflorescência de *S. adstringens* na longevidade de abelhas adultas e constataram que metade da população controle sobreviveu, aproximadamente, o dobro do tempo, quando comparado

com os grupos testes. Cintra *et al.* (2003) realizaram bioensaios com inflorescências desidratadas de *S. adstringens* incorporadas aos alimentos oferecidos às operárias de *A. mellifera*, sendo evidenciado a toxicidade do macerado das plantas para as abelhas. Outras pesquisas para avaliar a toxicidade de extratos do barbatimão para as abelhas adultas foram desenvolvidas por: Carbonari *et al.* (1998), Cintra *et al.* (1998), Santoro *et al.* (2004), Souza *et al.* (2006) e Almeida (2007). Porém, a toxicidade do pólen de barbatimão para as larvas das abelhas africanizadas foi citada por Message (1997) e, posteriormente, foi verificada por, Carvalho (1998), Carvalho *et al.* (1998), Santos (2000), Carvalho e Message (2004) e Castagnino *et al.* (2011). A pesquisa realizada por Carvalho (1998) demonstrou que a Cria Ensacada Brasileira ocorria na mesma época do florescimento do barbatimão (*S. polyphyllum*) e ao fornecer pólen dessa planta na dieta de larvas criadas em laboratório, os sintomas observados nas crias em condições naturais, foram reproduzidos em condições de laboratório.

Em relação às abelhas indígenas, Message *et al.* (1999) foram os primeiros a relacionar mortalidade de larvas encontradas nas colônias de *Melipona compressipes* com o pólen de barbatimão. Carvalho *et al.* (2003) e Souza *et al.* (2006) realizaram experimentos em condições de laboratório e revelaram a toxidade do barbatimão para *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona postica*, respectivamente.

3 – OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo principal estudar se as abelhas *A. mellifera* (africanizadas) possuem algum mecanismo de defesa à Cria Ensacada Brasileira, subsidiando programas de melhoramento genético que visem o seu controle. Além disso, verificar se o pólen de *S. polyphyllum* também é coletado por meliponíneos (*S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*) e qual é o seu efeito nas crias. Avaliar a toxicidade do *S. polyphyllum* para as larvas de abelhas africanizadas e dos meliponíneos criadas *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se colônias de *A. mellifera* apresentam diferenças na taxa de mortalidade de crias em relação à CEB;
2. Avaliar se colônias de *A. mellifera* apresentam diferenças na quantidade de pólen de *S. polyphyllum* coletado;
3. Avaliar a sobrevivência e a coleta de pólen de *S. polyphyllum* de colônias contendo rainhas filhas de matrizes;
4. Verificar se os meliponíneos (*Scaptotrigona aff. depilis*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona testaceicornis*) coletam o pólen de *S. polyphyllum* e se ele causa mortalidade nas crias;
5. Avaliar a ação de produtos naturais oriundos de *S. polyphyllum* para as larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula*, *N. testaceicornis* e *A. mellifera* criadas *in vitro*;
6. Avaliar a toxicidade do pólen de *S. polyphyllum* para as larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula*, *N. testaceicornis* e *A. mellifera* criadas *in vitro*.

Capítulo 1

Avaliação de mecanismos de defesa de abelhas

***Apis mellifera* (africanizadas) aos efeitos tóxicos de
*Stryphnodendron polyphyllum***

1 – INTRODUÇÃO

Uma grande preocupação dos apicultores, principalmente, do sudeste brasileiro está relacionada com os altos índices de mortalidade das crias de *Apis mellifera* devido à ocorrência da Cria Ensacada Brasileira (CEB). Ela representa um grande obstáculo para a apicultura, pois tem a capacidade de dizimar todas as colônias existentes no apiário.

A CEB apresenta sintomas semelhantes à doença causada pelo vírus SBV (*Sac Brood Virus*), comum em diversos países (BAILEY; BALL, 1991). Entretanto, Message *et al.* (1995, 1996) e Message (1997) ao analisarem amostras de crias afetadas verificaram que o agente causador não era vírus ou outro agente microbiano. Devido a isto, Message (1997) denominou a mortalidade das crias de Cria Ensacada Brasileira e posteriormente foi identificado o agente causador, o pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* (CARVALHO, 1998; CARVALHO; MESSAGE, 2004). Segundo Carvalho e Message (2004), os sintomas tem início após as abelhas nutrizas alimentarem as larvas com o pólen do barbatimão das espécies *S. polyphyllum* e *S. adstringens*; isto causa intoxicação e interrompe o desenvolvimento, pois impede que as larvas passem para a fase de pupa; essas crias ao serem removidas das células com uma pinça pela região cefálica apresentam o formato de um saco devido ao acúmulo de líquido ecdisial.

Devido ao fato da CEB ser causada pela toxicidade do pólen de barbatimão, podendo pertencer ao grupo dos taninos (SANTOS, 2000), o melhor controle ainda é mudar os apiários para locais onde não tenha a planta em florescimento (MESSAGE, 1997). Castagnino *et al.* (2011) verificaram a presença da CEB durante o florescimento de *S. adstringens* e recomendam a utilização do substituto de pólen (farinha de soja, fubá de milho e farinha de trigo na proporção 1:1:1, triturados para se obter um pó ultrafino e adicionado 5% de açúcar

cristal.) antes e durante a florada para reduzir os efeitos da CEB em enxames de abelhas africanizadas.

A preocupação devido à ocorrência da CEB e consequente perda das colônias motivaram-nos a realizar estudos que busquem mecanismos de defesa aos efeitos tóxicos do pólen de *S. polyphyllum*. Um mecanismo a ser pesquisado poderia estar relacionado com a baixa preferência ao forrageamento deste pólen. Foram realizadas pesquisas que revelaram que existe variabilidade entre colônias de *A. mellifera* em relação à preferência na coleta de pólen (NYE; MACKENSEN, 1965; SHIMANUKI *et al.*, 1967; FREE; WILLIAMS, 1973; BASUALDO *et al.*, 2000) e também que é possível selecionar colônias para alta ou baixa coleta de determinados tipos de pólen (NYE; MACKENSEN, 1970; DAG *et al.*, 2005; BASUALDO *et al.*, 2007). Contudo, outro mecanismo a ser estudado poderia ser a resistência larval aos efeitos tóxicos desse pólen.

Apesar de várias pesquisas mostrarem a toxicidade do barbatimão para as abelhas e da enorme perda de colônias devido à presença dessas árvores próximas dos apiários, não há nenhum estudo revelando se as abelhas africanizadas possuem algum mecanismo de defesa quando expostas a esse pólen, portanto torna-se necessário realizar estudos nesse sentido.

2 – OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar se as abelhas *A. mellifera* (africanizadas) possuem algum mecanismo de defesa aos efeitos tóxicos do pólen de *S. polyphyllum*, subsidiando programas de melhoramento genético que visem o controle da Cria Ensacada Brasileira.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

1. Avaliar se colônias de *A. mellifera* apresentam diferenças na taxa de mortalidade de crias em relação à CEB;
2. Avaliar se colônias de *A. mellifera* apresentam diferenças na quantidade de pólen de *S. polyphyllum* coletado;
3. Avaliar a sobrevivência e a coleta de pólen de *S. polyphyllum* de colônias contendo rainhas filhas de matrizes.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de campo foram realizados em 5 apiários diferentes localizados no Município de Altinópolis/ São Paulo, sendo eles:

1 - Apiário Experimental - localizado a $20^{\circ} 57' 54,2''$ de latitude sul e $47^{\circ} 17' 33,1''$ de longitude oeste na zona rural identificada como Fazenda Água Limpa – Rodovia Altino Arantes, Km 18. O apiário encontra-se em uma área de cerrado e nas proximidades existem plantações de eucalipto.

2 - Apiário 1 do Getúlio (1G) - localizado a $20^{\circ} 56' 19,0''$ de latitude sul e $47^{\circ} 13' 04,2''$ de longitude oeste na zona rural identificada como Fazenda Lagoa Santa. O apiário encontra-se próximo a uma área de cerrado, eucalipto e de cana de açúcar.

3 - Apiário 2 do Getúlio (2G) – localizado a $20^{\circ} 56' 54,2''$ de latitude sul e $47^{\circ} 13' 03,2''$ de longitude oeste na zona rural identificada como Fazenda Antonio Justino – Morro da Mesa. O apiário encontra-se em uma área de cerrado e nas proximidades existem plantações de eucalipto.

4 - Apiário 3 do Getúlio (3G) – localizado a $20^{\circ} 55' 38,0''$ de latitude sul e $47^{\circ} 13' 19,4''$ de longitude oeste na zona rural identificada como Fazenda Serrinha. O apiário encontra-se próximo a uma área de cerrado, eucalipto e de cana de açúcar.

5 - Apiário 4 do Edmar (4E) - localizado a $20^{\circ} 56' 23,2''$ de latitude sul e $47^{\circ} 16' 59,7''$ de longitude oeste, na zona rural identificada como Serrinha. O apiário encontra-se próximo a uma área de cerrado e plantações de eucalipto.

3.1 - Experimento 1 - 2009

Esse experimento foi realizado no Apiário Experimental durante o período de Outubro até Dezembro de 2009, época de florescimento do barbatimão (*S. polyphyllum*). Foram utilizadas colônias de abelhas *A. mellifera* (africanizadas) selecionadas ao acaso, padronizadas quanto ao tamanho da sua população e instaladas em caixas modelo Langstroth, inicialmente com um ninho para postura da rainha e armazenamento de pólen e mel. Para realizar as coletas de pólen foi acoplado permanentemente em cada colmeia um coletor de pólen tipo intermediário. Foram utilizadas 22 colônias de abelhas africanizadas, conforme descrito abaixo:

10 colméias com coletores de pólen – a coleta de pólen dos coletores foi realizada semanalmente. Todas as amostras coletadas foram identificadas, acondicionadas no Freezer e, posteriormente, foram utilizadas para montagem de lâminas permanentes. As crias dessas colônias foram mapeadas semanalmente para verificar a ocorrência da CEB.

4 colméias (extras) com coletores de pólen – a coleta de pólen dos coletores foi realizada semanalmente. Esse pólen foi separado por cor e analisado microscopicamente para identificar o pólen de barbatimão a ser utilizado em bioensaios. Em todas as colônias foram realizadas revisões semanais nos quadros de crias para observar a ocorrência da CEB.

8 colônias sem coletores de pólen – nessas colônias foram realizadas revisões semanais nos quadros de crias para observar a ocorrência da CEB.

3.2 – Preparo das amostras de pólen

As amostras de pólen foram preparadas pelo método clássico europeu de Maurizio e Louveaux (1965) sem o uso da acetólise, com algumas modificações sugeridas por Barth (1989) e Modro (2006). De cada amostra foi montada lâminas permanentes em triplicata, com

uso de gelatina glicerinada preparada conforme o método de Kisser (BARTH, 1989) e seladas com parafina. Os grãos de pólen de barbatimão, constantes nas amostras de cada colônia, foram analisados quantitativamente, contando-se 300 grãos de pólen por lâmina e anotando-se o número de grãos de pólen de barbatimão presentes; essa contagem foi adaptada de Lopes et al. (2008). Para cada amostra foi calculada a média dos grãos de pólen de barbatimão presentes nas três lâminas e expressos em porcentagem.

3.3. Mapeamento das crias

Para realizar o mapeamento das crias foi coletado um quadro de cada colônia, contendo crias com idade de quatro a cinco dias; um pedaço de papel celofane foi colocado sobre esse quadro e com uma caneta de tinta permanente realizou-se a marcação de 100 crias. Foram feitas marcações nas laterais desse favo e copiadas no papel celofane para identificação da área mapeada. A seguir o quadro foi identificado na parte superior e devolvido na colmeia. O papel celofane foi identificado com o número da colmeia e com a data do mapeamento (Figura 1). Na semana seguinte realizou-se a leitura desse mapeamento e assim sucessivamente, até o final do florescimento do barbatimão. As crias mapeadas foram desoperculadas com uso de uma pinça, tomando-se o cuidado de não causar nenhum dano às crias sadias. Aquelas que estavam mortas foram retiradas para observar se apresentavam os sintomas característicos da CEB (Figura 2), sendo anotado, a seguir, o número dessas crias. A sobrevivência das crias de cada colônia foi expressa em porcentagem.

Figura 1 – Quadro de *A. mellifera* mostrando a área do mapeamento realizado no papel celofane, contendo as crias que foram mapeadas e estão operculadas.

Figura 2 – Favo contendo crias desoperculadas com sintomas da CEB.

3.4 – Produção de abelhas rainhas

No dia 17 de Novembro de 2009 retirou-se 10 rainhas das colônias que estavam sendo analisadas para serem transportadas e introduzidas em enxames instalados na APTA – Pindamonhangaba. Essas rainhas foram retiradas porque estava ocorrendo uma grande perda dos enxames devido à ocorrência da CEB. Apesar de todos serem susceptíveis a doença realizou-se a transferência das larvas de cada uma dessas colônias para produção de rainhas (filhas), as quais foram fecundadas naturalmente nos apiários da APTA e analisadas durante a florada do barbatimão em 2010.

3.5 – Experimento 2 - 2010

Esse experimento foi realizado em 5 apiários diferentes durante o período de Outubro até Dezembro de 2010, época de florescimento do barbatimão. Foram utilizadas 92 colônias de abelhas africanizadas.

3.5.1. – Experimento no apiário experimental

Nesse local foram instaladas 16 colônias conforme descrito abaixo:

- 10 colméias (extras) com coletores de pólen – para realizar as coletas de pólen foi acoplado permanentemente em cada colmeia um coletor de pólen tipo intermediário. A coleta foi realizada a cada 15-20 dias, sendo o pólen separado por cor e analisado microscopicamente para identificar o pólen de barbatimão para ser utilizado em bioensaios. Em todas as colônias foram realizadas revisões, com intervalos de 15 a 20 dias, nos quadros de cria para verificar a ocorrência da CEB.
- 6 colônias sem coletores de pólen – tais enxames vieram de Pindamonhangaba contendo rainhas filhas das rainhas de 2009 sendo as seguintes colônias:

136F – filha da rainha 2009 – 1^a mais Susceptível (1S);

1072 F – filha da rainha 2009 – 2^a mais Susceptível (2S);

66 F - filha da rainha 2009 – 3^a mais Susceptível (3S);

5028 F – filha da rainha 2009 - 4^a mais Susceptível (4S);

82 F – filha da rainha 2009 – 5^a mais Susceptível (5S);

1388 F – filha da rainha 2009 - 6^a mais Susceptível (6S).

As colônias foram instaladas em caixas modelo Langstroth composta de um ninho com 10 quadros e foram padronizadas quanto ao tamanho da sua população. Em todas as 6 colônias foi coletado o pólen estocado no favo e realizado o mapeamento de aproximadamente 100 crias. As crias foram mapeadas semanalmente para verificar a ocorrência da CEB conforme descrito anteriormente (item 3.3). O pólen estocado no favo foi coletado em intervalos semanais, com a retirada do pólen recém- armazenado em 15 a 20 alvéolos, de maneira aleatória e distribuído no favo de cria. Esse pólen foi utilizado para montagem de lâminas permanente e para contagem dos grãos de pólen de barbatimão presentes nas lâminas, conforme descrito anteriormente (item 3.2).

3.5.2 – Experimento nos apiários dos apicultores

Com a coloraboração de dois Apicultores conseguimos um total de 76 colônias de abelhas africanizadas instaladas em um ninho e um sobre ninho e distribuídas em 4 apiários na região de Altinópolis onde ocorre florescimento do barbatimão da seguinte maneira:

Apiário 1 G - contendo 15 colônias;

Apiário 2 G – contendo 12 colônias;

Apiário 3 G – contendo 26 colônias;

Apiário 4 E – contendo 23 colônias.

As colônias foram padronizadas quanto ao tamanho da sua população e utilizadas para a coleta de pólen dos favos. O pólen estocado no favo foi coletado em intervalos quinzenais, com a retirada do pólen recém- armazenado em 15 a 20 alvéolos, de maneira aleatória e distribuído no favo de cria. Esse pólen foi utilizado para montagem de lâminas permanente e para contagem dos grãos de pólen de barbatimão presentes nas lâminas, conforme descrito anteriormente (item 3.2). Também, foram realizadas revisões quinzenais nos quadros de crias das colônias para anotar se a mesma apresentava os sintomas da CEB.

3.6 - Produção de rainhas – filhas das matrizes selecionadas

O presente trabalho desenvolveu-se no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para a realização desta parte do trabalho foi preparado e transportado para esse local um núcleo órfão contendo boa população de abelhas adultas, um quadro com boas reservas de mel e pólen e os quadros com ovos e larvas recém-nascidas das colônias selecionadas e instaladas nos apiários de Altinópolis. As larvas foram transferidas dos quadros das 4 colônias selecionadas, conforme metodologia de transferência simples de larvas desenvolvida por Doolittle (1899), para a produção das rainhas (LAIDLAW JR, 1998). Após a emergência 25 rainhas foram marcadas com etiquetas coloridas e numeradas, em seguida foram introduzidas em núcleos órfãos padronizados com boa população e reservas de mel e pólen. Os núcleos modelo Langstroth onde foram introduzidas às rainhas possuíam telas excludoras nos alvados para evitar que elas realizassem voos de acasalamento. Após 7 dias foram inseminadas instrumentalmente 2 filhas de cada matriz, resultando em 8 rainhas inseminadas instrumentalmente com 8ul de sêmen de zangões provenientes das mesmas matrizes selecionadas. As inseminações instrumentais

foram realizadas utilizando o aparelho desenvolvido por Gonçalves e Brites (1970). Devido ao fato de não conseguirmos mais zangões maduros das matrizes para coleta do sêmen transportamos os núcleos contendo as 17 rainhas restantes para fecundação natural nos apiários situados em Altinópolis, resultando em 16 rainhas fecundadas naturalmente.

Os núcleos contendo as rainhas inseminadas instrumentalmente foram mantidos no apiário experimental da USP para acompanhamento do desenvolvimento dessas colônias. Após substituição das populações pelas filhas das novas rainhas esperou-se até que as operárias estivessem na fase de campeiras, período de aproximadamente 2 meses após o início da postura das rainhas, pois assim teríamos certeza que ao iniciarmos o experimento a coleta do pólen seria realizada pelas filhas das novas rainhas. Após esse período (final de outubro de 2011) os enxames foram transportados para os apiários localizados em Altinópolis.

3.7 – Experimento 3 - 2011

O experimento foi realizado em 4 apiários diferentes durante o período de novembro de 2011 até janeiro de 2012, época de florescimento do barbatimão. Foram utilizadas 53 colônias de abelhas africanizadas distribuídas da seguinte maneira:

► **No Apiário 1G** foram instaladas 4 colônias com rainhas filhas inseminadas instrumentalmente + 8 colônias (2 com as rainhas matrizes e 6 com as rainhas filhas fecundadas naturalmente) que já estavam fixas no local. As colmeias contendo essas colônias foram identificadas da seguinte maneira: **G4B, G13B, E20C e E26A** (contendo as colônias com 4 rainhas filhas inseminadas instrumentalmente); **G4 e G13** (contendo as colônias com 2 rainhas matrizes); **G4E, G4F, G4USP, G13E, G13F e G13USP** (contendo as colônias com 6 rainhas filhas fecundadas naturalmente - 3 filhas da matriz G4 e 3 filhas da matriz G13). As crias dessas colônias foram mapeadas semanalmente para verificar a ocorrência da CEB. O

pólen dos favos foi coletado e utilizado para confecção de lâminas, conforme citado anteriormente (item 3.2).

► **No Apiário 2G** foram instaladas somente 3 colônias com rainhas filhas inseminadas instrumentalmente. As colmeias contendo essas colônias foram identificadas como: **G13C, G4D e E26C**. As crias das colônias foram mapeadas semanalmente para verificar a ocorrência da CEB. O pólen dos favos foi coletado e utilizado para confecção de lâminas, conforme citado anteriormente (item 3.2).

► **No Apiário 4E** foram utilizadas 12 colônias (2 colônias contendo rainhas matrizes e 10 colônias contendo as rainhas filhas fecundadas naturalmente) que já estavam fixas nesse apiário. As colmeias contendo essas colônias foram identificadas da seguinte maneira:

E20 e E26 (contendo as colônias com 2 rainhas matrizes); **E20J, E20K, E20L, E20M, E20N, E20P, E26F, E26G, E26H e E26I** (contendo as colônias com 10 rainhas filhas fecundadas naturalmente - 6 filhas da matriz E20 e 4 filhas da matriz E26). Foi realizada, uma vez por semana, uma revisão nos quadros de crias das colônias para anotar se apresentavam os sintomas da CEB.

► **No Apiário Experimental** foram utilizadas 26 colônias que já estavam fixas no local. Foi realizada uma revisão semanal nos quadros de crias das colônias para anotar se apresentavam os sintomas da CEB.

3.8 – Análise estatística

Os resultados dos experimentos relacionados à sobrevivência das crias e coleta do pólen de barbatimão foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) com médias comparadas por meio do teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$). O programa SAS foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos em relação a coleta de pólen e a sobrevivência das diferentes colônias durante o ano de 2009 estão representados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Porcentagem dos grãos de pólen coletados pelas diferentes colônias.

Figura 2 – Médias da sobrevivência das crias das diferentes colônias.

A coleta de pólen de barbatimão não foi diferente entre as colônias (ANOVA, $F=0,92$; $R^2=0,48$; $p > 0.0001$). A sobrevivência das crias, também, não foi diferente (ANOVA, $F=1,54$; $R^2=0,74$; $p > 0.0001$). Todas as colônias do apiário Experimental coletaram o pólen de barbatimão. Embora não encontramos diferenças significativas entre as colônias, observamos que a colônia 5028 foi a que apresentou uma porcentagem maior desse pólen (Figura 1) e quando comparamos com os dados obtidos na Figura 2, notamos que a sobrevivência das crias dessa colônia foi maior do que a de colônias que apresentaram uma porcentagem menor de grãos desse pólen. Um mês após o início do experimento, todas as colônias apresentaram uma elevada mortalidade de crias com sintomas da CEB e perdemos todos os enxames que estavam nesse local.

Experimentos 2010

Os resultados do experimento realizado no apiário Experimental estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 3. Todas as colônias que estavam nesse apiário coletaram o pólen de barbatimão. As colônias 82 e 5028 apresentaram uma quantidade maior de pólen na primeira coleta em relação as outras colônias (Figura 3). A quantidade de pólen de barbatimão presente nas outras colônias, também, apresentaram porcentagens diferentes conforme a data da coleta. A colônia 136 apresentou uma quantidade muito maior na terceira coleta do que as outras colônias (Figura 3). Após a terceira coleta, todos os enxames que estavam nesse local morreram com sintomas da CEB.

Tabela 1 - Médias dos grãos de pólen de barbatimão, presente em amostras de diferentes colônias, durante o ano de 2010, Apiário experimental, Altinópolis – SP.

Colonias	% Grãos de pólen barbatimão			Médias	EP
	C 1	C2	C3		
66 F	3,7	1,8		2,75	0,95
82 F	12			12	-
136 F	4	2,4	22,5	9,63	6,45
1072 F	3,6	2,6	10,3	5,5	2,41
1388 F	1,7	5,5	11,4	6,2	2,82
5028 F	15,3			15,3	-

Figura 3 – Porcentagem de grãos de pólen de barbatimão presentes nas diferentes coletas realizadas nas colônias do Apiário Experimental.

Os resultados das 76 colônias distribuídas nos 4 apiários estão apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7. A coleta de pólen de barbatimão foi diferente entre as colônias (ANOVA, $F= 3,21$; $R^2= 0,79$; $p < 0.0001$) e também entre os apiários (ANOVA, $F= 32,15$; $R^2= 0,79$; $p < 0.0001$). A transformação dos dados foi necessária. A coleta de pólen no Apiário 1G e 2G foi estatisticamente diferente dos Apiários 3G e 4E (Tukey's Studentized Range - HSD, $p < 0,05$) não havendo diferenças significativas entre os Apiários 1G e 2G e entre os Apiários 3G e 4E (Tukey - HSD, $p > 0,05$). Nos Apiários 1G e 2G as coletas foram menores quando comparadas com os Apiários 3G e 4E (Figuras 4, 5, 6 e 7).

No apiário 1G, as colônias 4 e 13 não apresentaram pólen de barbatimão (Figura 4). Nas revisões que foram realizadas até o final do florescimento do barbatimão, não detectamos nenhuma cria com sintomas da CEB e, devido a isto, elas foram selecionadas como matrizes para produção de rainhas. Nos apiários 2G e 3G, todas as colônias coletaram o pólen de barbatimão (Figuras 5 e 6). Nesses apiários todas as colônias apresentaram sintomas da CEB. Os resultados das colônias presentes no apiário 4E estão apresentados na Figura 7; podemos observar que a colônia 90 foi a única que não coletou o pólen de barbatimão. As crias dessa colônia não apresentaram sintomas da CEB, portanto ela foi selecionada como matriz para a

produção de rainhas. A colônia 92 coletou muito pouco pólen de barbatimão e como não observamos sintomas da CEB nas crias dessa colônia (diferente das outras colônias), ela foi selecionada como matriz para a produção de rainhas; totalizando assim 4 matrizes selecionadas entre as 92 que estavam em avaliação.

Figura 4 – Porcentagem de grãos de polén de barbatimão presentes nas diferentes coletas realizadas nas colônias do Apiário 1G.

Figura 5 – Porcentagem de grãos de polén de barbatimão presentes nas diferentes coletas realizadas nas colônias do Apiário 2G.

Figura 6 – Porcentagem de grãos de polén de barbatimão presentes nas diferentes coletas realizadas nas colônias do Apiário 3G.

Figura 7 – Porcentagem de grãos de polén de barbatimão presentes nas diferentes coletas realizadas nas colônias do Apiário 4E.

Tabela 2 - Mortalidade das colônias devido a ocorrência da CEB nos diferentes apiários (outubro – dezembro, 2010).

Apiários	Experimental	1G	2G	3G	4E
%	100 (n=16)	60 (n=15)	100 (n=12)	77 (n=26)	70 (n=23)

Experimento 2011

Os resultados, dos experimentos realizados durante o ano de 2011 estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 – Médias das sobrevivências e das coletas de pólen das diferentes colônias do Apiário 1G.

Figura 9 – Médias das sobrevivências e das coletas de pólen das diferentes colônias do Apiário 2G.

A sobrevivência das crias foi diferente entre as colônias do apiário 1G e entre os apiários (ANOVA, $F = 3,64$ e $F = 17,35$ respectivamente; $R^2 = 0,77$; $p < 0.0001$) (Figura 8). No apiário 2G todas as colônias foram perdidas devido a ocorrência da CEB, porém no apiário 1G foram perdidas 4 entre as 11 colônias que estavam no local (Figura 9).

Em relação a coleta do pólen ela foi diferente entre as colônias do apiário 1G (ANOVA, $F = 24,36$; $R^2 = 0,89$; $p < 0.0001$), sendo necessário a transformação desses dados. Entre os apiários não houve diferenças em relação a coleta desse pólen, conforme já verificado no experimento realizado em 2010 (ANOVA, $F = 6,34$; $R^2 = 0,89$; $p > 0.0001$); também foi necessário a transformação dos dados.

Podemos observar, conforme os dados apresentados na figura 8, que no Apiário 1G as duas matrizes G4M e G13M coletaram o pólen de barbatimão (0,74% e 0,2%); porém não foi observada nenhuma cria com sintomas de CEB e a sobrevivência de 95% e 98%, respectivamente, pode estar relacionada a remoção de crias devido a algum outro fator.

No Apiário 1G as colônias contendo as filhas inseminadas G4B e G13B apresentaram sobrevivência de 98,2 e 89,2, respectivamente. Na Figura 8, observamos que a coleta de pólen nessas colônias foi de 0,46 e 0%. Apesar de não encontramos o pólen de barbatimão nas amostras coletadas da colônia G13B, ela apresentou poucas crias mortas com sintomas da CEB. Na outra colônia G4B, que encontramos 0,46% do pólen de barbatimão, não foi observado nenhuma cria com sintoma de CEB. As outras 2 colônias contendo as filhas inseminadas E20C e E26A, apenas a E26A apresentou crias mortas com sintomas da CEB e após o enxame acabou morrendo. A outra colônia contendo a rainha inseminada E20C, foi perdida logo no início do experimento; encontramos o enxame morto devido ao ataque de formigas. Portanto, no Apiário 1G, das 4 colônias contendo as rainhas inseminadas, apenas 1 foi perdida devido ocorrência da CEB.

Nesse mesmo apiário, das colônias contendo as filhas fecundadas naturalmente (6), foram perdidas 3 colônias devido a ocorrência da CEB (duas filhas da matriz G4 e uma filha da matriz G13). Na figura 8 observamos que as colônias G4E, G4U e G13E coletaram uma quantidade maior de pólen de barbatimão do que as outras colônias; sendo notado que entre as colônias contendo as rainhas fecundadas naturalmente e as inseminadas, a colônia E26A (inseminada) foi a que coletou mais pólen de barbatimão (12,3%) e, também acabou sendo perdida devido à CEB. Portanto das 11 colônias que estavam no Apiário 1G, 7 permaneceram vivas e sem sintomas da CEB, resultando assim em 36,3% de mortalidade das colônias devido a ocorrência da CEB. Nesse mesmo apiário ainda estavam instaladas 8 colônias do apicultor e todas apresentaram sintomas da CEB e apesar de retirá-las do local, acabou perdendo todos os enxames.

No Apiário 2G, podemos observar, conforme os dados apresentados na figura 9, que as abelhas de todas as colônias coletaram o pólen de barbatimão e acabaram morrendo. Outros 3 enxames que já estavam instalados nesse local, também morreram com sintomas da CEB.

No Apiário 4E, das 12 colônias sobreviveram apenas a matriz E20 e duas colônias contendo rainhas filhas dessa rainha. Todos os outros enxames foram perdidos com sintomas da CEB, inclusive a matriz E26. Porém, essas 3 colônias que restaram no local apresentaram sintomas de uma doença e, devido a isso, a matriz E20 foi excluída dessa seleção, pois poderíamos disseminar outra doença entre os apiários.

No Apiário Experimental estavam instaladas 26 colônias que não estavam participando da seleção realizada anteriormente, mas foram observadas e constatamos que todos os enxames morreram devido a ocorrência da CEB.

5 - DISCUSSÃO

Em 2009, todas as colônias que estavam no Apiário Experimental morreram devido à ocorrência da CEB, porém notamos que nem todas as colônias que apresentaram maior número de grãos de pólen de barbatimão foram as que apresentaram maior número de crias mortas nos quadros que foram mapeados. Nas observações realizadas, sempre foi observado todos os quadros contendo crias e não somente aquele que era mapeado; podendo assim, assegurar qual colônia realmente apresentava mortalidade devido a ocorrência da CEB. Notamos que a metodologia de mapeamento das crias, relacionadas a coleta do pólen, nem sempre nós garantiu que não estava ocorrendo mortalidade de crias com sintomas de CEB, ou que as abelhas não coletaram o pólen de barbatimão. Podemos concluir isto, pois em várias vezes foi observado crias com sintomas de CEB em outros quadros das colônias, embora o quadro mapeado não apresentasse crias mortas. Em relação à coleta do pólen, sempre coletamos pólen que estava sendo recém depositado nos favos e talvez o pólen de barbatimão já estivesse depositado em outra célula contendo pólen mais velhos. Em outras observações realizadas, também encontramos crias mortas com sintomas da CEB fora da época de florescimento do barbatimão; e isto possivelmente, está relacionado à utilização de pólen que já estava estocado nos favos e foi utilizado na alimentação das larvas, conforme as necessidades das colônias. É preciso ressaltar que, além do mapeamento das crias para observar sintomas da CEB, também é necessário revisar todos os quadros de cria e anotar qualquer anormalidade que esteja ocorrendo.

A coleta de pólen dos favos mostrou ser uma técnica viável em estudos com o objetivo de levantar os tipos polínicos ofertados durante as estações do ano, pois observamos que os grãos de pólen presentes nas lâminas coincidiram com as flores disponíveis nos apiários. De acordo com Modro (2010), a composição polínica das cargas de pólen (pólen do coletor) e pão de abelhas (pólen estocado no favo) é similar dentro das estações; assim a análise do pão

de abelhas em detrimento das cargas de pólen pode ser uma alternativa mais rápida e econômica para estudos palinológicos visando a determinação da origem botânica do pólen nas diferentes estações climáticas do ano.

Em 2010 e 2011, perdemos todas as colônias que foram instaladas no Apiário experimental, sendo que essa alta mortalidade dos enxames também foi encontrada em anos anteriores, segundo informações de apicultores. Como podemos observar, a perda de colônias devido a ocorrência da CEB é grande, dependendo do local de instalação dos apiários. Locais que apresentam florescimento de várias plantas, durante um mesmo período, podem contribuir para que as abelhas realizem a coleta diversificando em várias plantas, estabelecendo assim, um balanço nutricional e uma possível diluição da potencialidade tóxica das plantas que apresentem algum dano para elas.

Observamos em 2010 que as abelhas apresentaram uma coleta diferente de pólen de barbatimão entre os apiários e também entre as colônias. Segundo Michener (1974), as abelhas coletam substancial quantidade de pólen por coleta, aproximadamente 30mg, e para conseguir tal carga as abelhas precisam visitar muitas flores.

Vários estudos avaliando as preferências de forrageamento das abelhas por fontes alimentares sugerem que estas demonstram diferenças de atratividade de acordo com as características de coloração e de odor das flores. A identificação das formas florais pelas abelhas foi observada por vários autores, promovendo uma procura repetida pela mesma fonte de alimento, devido a sua capacidade de aprendizagem. Segundo Pernal e Currie (2002), o comportamento forrageiro das abelhas não discrimina o tipo de pólen baseado em diferenças intrínsecas da qualidade. Modro (2010) demonstrou que a quantidade de pólen interceptada nos coletores, instalados em colmeias de *A. mellifera*, não esteve relacionada com a sua qualidade físico- química. De acordo com Page Júnior et al. (1995); Calderone e Page Júnior (1996); Pankiw, Tarpy e Page Júnior (2002), além de fatores ambientais, a coleta de recurso

pode estar relacionada com as características genéticas das abelhas demonstrando preferência de flora pela colônias.

Em 2010, das 92 colônias que estavam em avaliação, encontramos somente 3 colônias que não coletaram o pólen de barbatimão e 1 que coletou muito pouco; apesar deste recurso estar disponível no apiário, sugerindo que as abelhas dessa colônias podem estar sendo influenciadas por outros fatores que não apenas o de aprendizagem anterior. Algum fator genético pode estar influenciando no comportamento de coleta de pólen dessas colônias. Modro (2006) observou 1 colônia que não coletou pólen de *Cecropia* durante o período estudado, apesar deste recurso estar disponível no apiário, sugerindo que algum fator genético poderia estar influenciando no comportamento de coleta de pólen dessa colônia. Nye e Mackensen (1965) selecionaram linhagens para baixa e alta preferência na coleta de pólen de alfafa, indicando que essas preferências diferenciadas por recursos abundantes em uma determinada região pode ser devido a fatores de controle genético. Estudos foram realizados para estudar a variabilidade entre colônias de abelhas, em relação à preferência para coleta de pólen, por diferentes autores (SHIMANUKI *et al.*, 1967; FREE e WILLIAMS, 1973; BASUALDO *et al.*, 2000). Outros estudos foram realizados para selecionar colônias para alta ou baixa coleta de determinados tipos de pólen (NYE e MACKENSEN, 1970; DAG *et al.*, 2005; BASUALDO *et al.*, 2007), evidenciando a existência de um componente genético para esse comportamento e a possibilidade de seleção de abelhas que apresentem essas características e, citam que os resultados esperados podem ser satisfatórios após 4 ou 6 gerações. Somente quando trabalhamos com um número maior de colônias conseguimos selecionar 3 que não coletaram o pólen de barbatimão e os resultados obtidos com as rainhas filhas dessas matrizes mostraram-se promissores, pois algumas delas ao final do experimento estavam com população excelente e com produção de mel; enquanto que os apicultores perderam a maioria das colônias e as que restaram estavam muito enfraquecidas. É importante

que os apicultores se conscientizem que a seleção de colônias, para qualquer característica desejada, pode ser demorada e requer paciência, entretanto os ganhos alcançados podem ser duradouros. Em 2010 nossos resultados revelaram a existência de uma diferença na coleta de pólen de barbatimão entre as colônias e entre os 4 apiários estudados, sendo uma informação importante para os apicultores da região.

Finalmente em 2011, no apiário 1G observamos que embora as 2 colônias matrizes tenham coletado um pouco do pólen de barbatimão, suas crias não foram afetadas; o mesmo ocorrendo com a maioria das colônias contendo as rainhas filhas inseminadas instrumentalmente e fecundadas naturalmente, pois das inseminadas perdemos apenas 1 entre 4 e, das fecundadas perdemos 3 entre 6, devido a CEB; com possibilidades que nas próximas gerações os resultados sejam ainda mais satisfatórios.

No Apiário 2G, as 3 colônias com rainhas inseminadas instrumentalmente foram perdidas devido a CEB, refletindo assim na importância da flora existente na instalação dos apiários. Em época de escassez de recursos as abelhas coletam nas fontes florais disponíveis, sendo que estas espécies quando em baixa concentração de indivíduos ou de flores por indivíduo, oferecem recursos reduzidos às abelhas. Ao aumentar o número de espécies poliníferas disponíveis, as abelhas têm seus recursos ampliados (MODRO, 2006). No apiário 2G existe uma quantidade enorme de árvores de barbatimão, apresentando várias flores por indivíduos e cujo florescimento dura 3 meses, as abelhas são “forçadas” a coletarem nessas fontes, justificando assim a mortalidade dessas colônias das rainhas inseminadas. O número de plantas de barbatimão no apiário, provavelmente, exerce grande influência na taxa de mortalidade das colônias e se não existirem plantas alternativas que sejam utilizadas como fontes de pólen, isso poderá intensificar ainda mais o efeito do barbatimão sobre as colônias de *A. mellifera*.

No apiário 4E eliminamos uma matriz e duas filhas fecundadas naturalmente devido a ocorrência de uma doença presente nas crias. Todos os outros enxames foram perdidos com sintomas da CEB, inclusive a matriz E26. No ano anterior essa colônia apresentou baixa quantidade de coleta do pólen de barbatimão, a qual foi selecionada, tendo em vista que as outras colônias que estavam no mesmo local coletaram uma quantidade maior. Talvez nesse ano as árvores de barbatimão tenham apresentado uma produção maior de pólen do que as outras árvores do local e possivelmente isso tenha influenciado no comportamento das abelhas dessas colônias. Isso também pode justificar a perda da colônia do Apiário 1G contendo uma rainha inseminada, filha dessa matriz, que morreu devido a ocorrência da CEB.

A nossa hipótese de resistência larval a esse pólen não foi confirmada, pois transferimos a colônia G13F (contendo rainha fecundada naturalmente) que estava no Apiário 1G, não apresentou nenhuma cria com sintomas da CEB e, coletou apenas 0,02% do pólen de barbatimão nesse local, para o Apiário 2G, no final de dezembro e final de florescimento do barbatimão. Após 2 semanas observamos uma mortalidade de 5% das crias com sintomas da CEB e a presença de 0,7% de grãos de pólen de barbatimão na amostra coletada. Essa colônia permaneceu com a população forte e o enxame ao final do experimento não apresentou mais nenhum sintoma da CEB. Este fato confirma que se o pólen for coletado e utilizado na alimentação das crias, elas irão apresentar sintomas da CEB, o que nos leva a concluir que as crias não apresentam resistência fisiológica á toxicidade desse pólen. Esse fato também foi confirmado em condições de laboratório, pois transferimos larvas das 4 colônias selecionadas em 2010 e ao alimenta-las com a dieta contendo o pólen de barbatimão, todas morreram com sintomas da CEB. Isto evidencia a importância da seleção para a baixa preferência na coleta do pólen de barbatimão e também da localização dos apiários.

Os resultados obtidos poderão contribuir para que novas pesquisas sejam realizadas com o intuito de compreender o mecanismo para a baixa preferência na coleta do pólen de

barbatimão e para que programas de seleção sejam realizados nesse sentido. Esses resultados contribuem para que os apicultores instalem seus apiários em regiões que não tenham o barbatimão ou tenham poucas árvores e principalmente opções de outras fontes para coleta de pólen durante os meses de florescimento dessa árvore. Sendo assim, poderemos diminuir os danos causados as colônias devido à coleta desse pólen, atualmente, considerado como um dos piores problemas da apicultura no sudeste do Brasil.

Capítulo 2

**Coleta de pólen de *Stryphnodendron polyphyllum*
(Fabaceae) por meliponíneos e seu efeito nas crias**

1 - INTRODUÇÃO

A preocupação devido a perdas significativas das abelhas *Apis mellifera*, que ocorreu em várias partes do mundo, serve como um alerta para darmos maior prioridade à sanidade não só dessas abelhas, mas também das abelhas sem ferrão. O declínio das colônias de *A. mellifera* fez com que a busca da criação em escala de outros polinizadores aumentasse. Assim, são citadas como polinizadoras substitutas as abelhas solitárias *Megachile* e *Osmia* (BOSCH; KEMP, 2002), as abelhas *Bombus terrestris* e outras espécies desse gênero (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006) e as abelhas sem ferrão (SLAA *et al.*, 2006). Outros gêneros de importância no Brasil são as abelhas *Xylocopa* (FREITAS; OLIVEIRA-FILHO, 2001) e *Centris* (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN 2009).

No Brasil, o uso de abelhas sem ferrão (Meliponini) vem ganhando espaço nos últimos anos. Essas abelhas possuem certas características vantajosas para a polinização de determinadas culturas em ambiente protegido, nas quais geralmente utiliza-se *A. mellifera*, sendo citadas: a ausência de um ferrão funcional, a sociabilidade, a baixa defensibilidade, a menor amplitude do voo de forrageamento e a perenidade das colônias (MALAGODI-BRAGA *et al.*, 2004).

Santos *et al.* (2008) demonstraram que *Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* podem ser usadas com sucesso e eficiência como polinizadoras de pepinos (*Cucumis sativus* var. caipira) sob cultivo protegido durante o inverno. Malagodi-Braga (2002) e Roselino (2005) verificaram o papel de *N. testaceicornis* na polinização de morangueiro (*Fragaria ananassa*) em ambiente protegido, frutos oriundos de flores polinizadas por estas abelhas foram mais pesados, quando comparados àqueles produzidos nas casas de vegetação sem a presença de abelhas. Malagodi-Braga e Kleinert (2004) concluíram que *Tetragonisca angustula* foi efetiva na polinização de dois cultivares de morangueiro sob cultivo fechado. Além disso, os meliponíneos são considerados importantes

polinizadores de diversas espécies de plantas nativas e cultivadas (KEVAN; IMPERATRIZ-FONSECA, 2002).

Apesar dessa importância, são poucos os estudos realizados no Brasil que abordam sobre as doenças relacionadas a essas abelhas; diferentemente do que ocorre com *A. mellifera*, onde existem vários estudos relatando a ocorrência de doenças. Nogueira-Neto (1999) relatou a mortalidade de larvas e pré-pupas em colônias de *Scaptotrigona postica*, *T. angustula*, *Plebeia* spp, *Cephalotrigona capitata* e *Melipona quadrifasciata*. Message *et al.* (1999) relataram a mortalidade de crias de *Melipona compressipes* devido ao pólen de *Stryphnodendron* spp. Carvalho *et al.* (2002) e Souza *et al.* (2006) realizaram experimentos em condições de laboratório e revelaram a toxicidade do barbatimão para *M. quadrifasciata* e *S. postica*, respectivamente. No Brasil, estudos mostraram que o pólen do barbatimão é o responsável pela perda de inúmeras colônias de abelhas africanizadas, causando intoxicação e mortalidade de pré-pupas, denominada de Cria Ensacada Brasileira (CEB). Baseado nestas informações, este estudo teve como objetivo analisar se as abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*, importantes polinizadores como mencionado acima, coletam este pólen e se ele causa mortalidade das crias.

2 - OBJETIVOS

- verificar se as abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* coletam o pólen de barbatimão;
- avaliar se as crias dessas abelhas são susceptíveis aos efeitos tóxicos do pólen de barbatimão.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Área experimental

O estudo foi desenvolvido na zona rural (20° 57' 54,2"S e 47° 17' 33,1"W), Fazenda Água Limpa, Rodovia Altino Arantes, Km 18, localizada no município de Altinópolis/SP. No local encontram-se muitas árvores de *S. pollyphyllum* (barbatimão); é uma área de cerrado e nas proximidades encontram-se plantações de eucalipto. Nesse local sempre observamos grandes perdas de abelhas africanizadas devido à ocorrência da CEB. O experimento foi desenvolvido no período de outubro a dezembro de 2010, em virtude de coincidir com o período de florescimento do barbatimão.

3.2 - Espécies de abelhas

Para esse estudo foram utilizadas as abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini): *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*. As colônias mantidas em caixas para criação racional estavam no meliponário do Depto. de Genética da FMRP-USP e foram transportadas para o local do experimento em setembro, antes do florescimento do barbatimão. Foi realizada uma inspeção em todas as colônias para assegurar que elas não apresentavam nenhum sintoma de doença. Foram levadas para o local 3 colônias de *S. aff. depilis*, 3 colônias de *T. angustula* e 1 colônia de *N. testaceicornis*.

3.3 - Coleta de material vegetal

Foram coletados botões florais e ramos férteis das árvores conhecidas como barbatimão e presentes no local do experimento. O material coletado consistiu basicamente em ramos com folhas e flores, o qual foi herborizado e identificado com auxílio de botânicos do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. A partir dos botões

florais coletados foram confeccionadas lâminas palinológicas (conforme descrito no cap.1, item 3.2), as quais serviram como lâminas de referência.

3.4 - Coleta de pólen

Amostras do pólen, provenientes das colônias, foram coletadas utilizando-se duas técnicas (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2009):

1 - Bolotas de pólen obtidas das corbículas das abelhas campeiras. Para a obtenção das amostras, foram aprisionadas abelhas de cada espécie que retornavam com as cargas de pólen (Figura 1). Para isso, foi fechada a entrada das colmeias e capturadas as abelhas aleatoriamente com auxílio de um tubo plástico tipo Falcon, a carga de pólen foi retirada por meio de uma leve pressão na corbícula da operária, que em seguida foi liberada.

2 - Pólen obtido dos potes de armazenamento no interior das colônias (Figura 2). As amostras foram obtidas somente quando observamos o pólen estocado em potes novos, o que foi realizado através das observações diretas.

Todas as amostras foram identificadas, acondicionadas no Freezer e posteriormente foram preparadas conforme descrito anteriormente (cap. 1 - item 3.2).

3.5 - Observação das crias

Favos de crias que apresentaram alguma anormalidade (células de crias desoperculadas, presença de crias sendo removidas ou crias mortas) foram coletados para posterior verificação de ocorrência de crias com sintomas de doença (Figura 3).

Figura 1 – Abelhas campeiras com cargas de pólen nas corbículas (*S. aff. depilis*).

Figura 2 – Colônia de *T. angustula* apresentando os potes de armazenamento de pólen utilizados para coleta de amostras.

Figura 3 – Favo de cria de *S. aff. depilis* apresentando anormalidades.

4 – RESULTADOS

A porcentagem de grãos de pólen de *S. polyphyllum* (barbatimão) encontrados nos potes de armazenamento de 1 colônia de *N. testaceicornis* (Nt 104), de 3 colônias de *T. angustula* (Ta 1272, Ta 1318 e Ta 1319) e de 3 colônias de *S. aff. depilis* (Sd 844, Sd 1010 e Sd 1042), durante o período estudado estão representados na Figura 4.

Figura 4 – Porcentagem de grãos de pólen de barbatimão encontrados nas amostras coletadas dos potes de armazenamento de 1 colônia de *N. testaceicornis* (Nt 104), de 3 colônias de *T. angustula* (Ta 1272, Ta 1318 e Ta 1319) e de 3 colônias de *S. aff. depilis* (Sd 844, Sd 1010 e Sd 1042).

Podemos observar que todas as colônias apresentaram o pólen de barbatimão estocado nos potes de armazenamento e que durante a Coleta 2 a porcentagem desse pólen foi maior em todas as colônias. As médias dos grãos de pólen de barbatimão encontradas nas 3 amostras coletadas do pote de armazenamento por cada uma das colônias estão representadas na Tabela 1 e na Figura 5.

Tabela 1 – Médias dos grãos de pólen de barbatimão presentes nas três amostras (C1, C2 e C3) coletadas dos potes de armazenamento de 1 colônias de *N. testaceicornis* (Nt 104), de 3 colônias de *T. angustula* (Ta 1272, Ta 1318 e Ta 1319) e de 3 colônias de *S. aff. depilis* (Sd 844, Sd 1010 e Sd 1042).

Colônias	% Grãos de pólen barbatimão			Médias	Desvio Padrão
	C 1	C2	C3		
Nt 104	1,3	20,6	1,6	7,83	11,05
Ta 1272	1,6	3,6	1	2,06	1,36
Ta 1318	0	2	0,6	0,86	1,02
Ta 1319	0	1,3	0	0,43	0,75
Sd 844	3,6	90	3,6	32,4	49,88
Sd 1010	2	45,6	1,6	16,4	25,28
Sd 1042	3	29	0	10,6	15,94

Figura 5 – Médias dos grãos de pólen de barbatimão presentes nas três amostras (C1, C2 e C3) coletadas dos potes de armazenamento de 1 colônias de *N. testaceicornis* (Nt 104), de 3 colônias de *T. angustula* (Ta 1272, Ta 1318 e Ta 1319) e de 3 colônias de *S. aff. depilis* (Sd 844, Sd 1010 e Sd 1042).

A partir dos dados apresentados na Tabela 1 e na Figura 5 podemos observar que as colônias de *S. aff. depillis* estocaram mais pólen de barbatimão nos potes do que as outras espécies de abelhas. Durante o período de florescimento do barbatimão, também foi observado as abelhas coletando o pólen nas flores dessas árvores, sendo sempre observado maior número de forrageiras de *S. aff. depilis*. Foi encontrado grãos de pólen de barbatimão nas amostras coletadas das corbículas de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* (Figura 6).

Foram encontrados favos com falhas nas áreas de crias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*. Após a contagem das falhas desses favos (Figura 7) podemos afirmar que *S.aff. depilis* apresentou mais células desoperculadas e com crias removidas do que as outras espécies (Tabela 2); este fato foi verificado quando realizávamos as revisões das colônias. A análise desses favos revelou a presença de crias mortas, com cor preta e marrom, algumas vezes contorcidas nas paredes das células (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 6 – Fotomicrografias de tipos polínicos observados nas amostras das corbículas de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* (seta indica a políade de *S. polyphyllum*).

Figura 7 – Favo de cria de *T. angustula* utilizado para contagem das células.

Tabela 2 – Porcentagem de crias desoperculadas e/ou removidas nas colônias de *S.aff. depilis* (Sd), *T. angustula* (Ta) e *N. testaceicornis* (Nt).

Colônia	Favo de cria – Número total de células	% de crias desoperculadas e/ou removidas
<i>Sd 1</i>	675	8,4
<i>Sd 2</i>	498	10,6
<i>Sd 3</i>	628	9,4
<i>Ta 1</i>	623	7,2
<i>Ta 2</i>	581	6,9
<i>Ta 3</i>	672	7,7
<i>Nt 1</i>	278	6,5

Figura 8 – (A) I = Favo de cria de *S. aff. depillis* com células normais, II = favo contendo células desoperculadas com crias mortas; (B) célula com cria morta; (C) crias mortas retiradas das células.

Figura 9 – Favo de cria de *T. angustula* contendo células desoperculadas, (seta indica cria morta retirada da célula).

Figura 10 – (A) Favo de cria de *N. testaceicornis* com células desoperculadas contendo crias mortas; (B) cria morta retirada da célula.

5 - DISCUSSÃO

O pólen de barbatimão esteve presente nas amostras coletadas dos potes de armazenamento de todas as colônias dos meliponíneos que foram instaladas no apiário Experimental, sendo que *S. aff. depilis* apresentou mais pólen de barbatimão nos potes do que as outras espécies. Talvez, isso tenha ocorrido devido ao número de indivíduos e a quantidade de favos de crias, pois as colônias de *S. aff. depilis* que foram transportados para o local estavam mais populosas e com maior quantidade de favos de crias do que às de *T. angustula* e *N. testaceicornis*. Portanto, é plausível que tenham forrageado e coletado mais pólen de barbatimão.

O pólen é um produto estocado em pequena quantidade e está diretamente associado as necessidades da colônia, sendo que o estoque de pólen, a presença e a quantidade de cria na colônia são fatores determinantes para coleta deste recurso pelas forrageiras (FREE; WILLIAMS, 1976; HELLMICH; ROTHENBUHLER, 1986; DRELLER; TARPY, 2000; CALDERONE; JOHNSON, 2002). De acordo com Oliveira (2009), os recursos a serem utilizados pelas abelhas dependem da sua disponibilidade na área de forrageio. Nesse apiário existem muitas árvores de barbatimão dentro e em todas as redondezas do apiário.

O barbatimão disponibiliza o pólen por longos períodos e na região de estudo seu florescimento, geralmente, vai de outubro até final de dezembro, com floradas abundantes, sobrepostas e atrativas. Segundo Marques-Souza (1999), geralmente os meliponíneos forrageiam as plantas com floração abundante e mais duradoura. Observamos muitos insetos nas flores do barbatimão, como moscas, coleópteros, lepidópteros e as abelhas. Entre as abelhas notamos que a maioria foram *A. mellifera* e *S. aff. depilis*. De acordo com Oliveira *et al.* (2009), quando colônias de diferentes espécies são instaladas em um mesmo apiário há uma tendência da coleta em fontes comuns de pólen e/ou néctar.

Nas revisões realizadas nas colônias observamos favos de cria com falhas, várias células desoperculadas e algumas contendo restos de crias mortas. Esse fato demonstra que as abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* possuem a capacidade de desopercular e remover crias mortas do interior de suas células. Nogueira-Neto (1999) observou esse mesmo comportamento em *T. angustula*, ou seja, mortalidade de crias e favos com falhas nas colônias afetadas.

Tenório (1996) utilizou as técnicas de congelamento e perfuração para matar as crias de *M. quadrifasciata* e *T. angustula* e observou que elas detectaram e removeram as crias mortas. Medina *et al.* (2009) observaram que *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona pectoralis* detectaram e removeram crias mortas pela técnica de congelamento. Nunes-Silva *et al.* (2009) observaram que a abelha *Plebeia remota* é capaz de reconhecer crias mortas pela técnica de perfuração e remove-las. Esses estudos não relatam o comportamento de remover crias mortas devido a doenças ou intoxicações, mas é uma forte evidencia que o comportamento higiênico das abelhas indígenas é uma reação a doenças ou outros fatores que resultem na mortalidade das crias.

Diferentemente do que ocorreu com as colônias de *A. mellifera*, que estavam no mesmo local, não houve nenhuma perda das colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*. Apesar das colônias dessas abelhas apresentarem falhas nos favos de cria e mortalidade das crias elas permaneceram no local por 3 anos consecutivos enquanto que todas as colônias de *A. mellifera* morreram devido a ocorrência da CEB.

As colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* apresentaram crias mortas, geralmente na fase pós defecante ou com idade um pouco mais avançada. Essas crias apresentaram coloração preta, marrom e às vezes com a região cefálica mais escura. Apesar das crias dessas colônias morrerem numa idade semelhante ao que ocorre com *A. mellifera*

não observamos nenhuma cria com acúmulo de líquido ecdisial. Em *A. mellifera* esse é um sintoma característico das crias mortas devido à ingestão do pólen de barbatimão. Porém as mortalidades observadas nas colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* coincidiram com o período em que se observou, no mesmo local, mortalidade das crias de abelhas africanizadas com sintomas da CEB.

Message *et al.* (1999) relataram a mortalidade de crias de *M. compressipes* devido ao pólen de *Stryphnodendron spp.* Carvalho *et al.* (2002) realizaram experimentos em condições de laboratório e revelaram a toxidade do pólen de *S. polyphyllum* para larvas de *M. quadrifasciata*. Souza (2006) também realizou experimento em laboratório e mostrou a toxidade do *S. adstringens* para abelhas adultas de *S. postica*. Esses resultados, somados aos apresentados nesse trabalho, sugerem que a mortalidade encontrada nas colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* pode ser devido a ingestão do pólen de *S. polyphyllum*, porém testes em condições de laboratório precisam ser realizados para assegurar que esse pólen tem efeito tóxico para as crias dessas colônias.

Capítulo 3

Bioensaios para avaliar a toxicidade de
Stryphnodendron polyphyllum em *Apis mellifera*,
Scaptotrigona aff. depilis, *Tetragonisca angustula* e
Nannotrigona testaceicornis

1 - INTRODUÇÃO

A técnica de criação de larvas de abelhas africanizadas em condições de laboratório foi desenvolvida por Silva (1995), posteriormente foi utilizada por Carvalho (1998) para avaliar se o pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* era o agente causador da Cria Ensacada Brasileira (CEB). Santos (2000) utilizou a técnica para estudos relacionados à CEB. Além dos estudos relacionados à CEB outros pesquisadores utilizaram a técnica para criar larvas das abelhas africanizadas *in vitro*: Almeida (2007) realizou experimentos para estudos relacionados a toxicidade do extrato de *S. adstringens*. Siqueira (2008) para avaliar o efeito da toxina Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*. Xavier (2009) para avaliar a toxicidade de inseticidas botânicos. Posteriormente, Alves (2010) para avaliar a toxicidade do nim (*Azadirachta indica*).

Camargo (1972) desenvolveu uma técnica para criar larvas de abelhas sem ferrão *in vitro*. Os primeiros experimentos foram realizados com a espécie *Scaptotrigona postica*, mas posteriormente outros pesquisadores utilizaram a técnica em diversas espécies (ALMEIDA, 1974; CAMPOS; COSTA, 1989; MACIEL-SILVA; KERR, 1991; HARTFELDE; ENGELS, 1992; BEZERRA, 1995; MENEZES, 2006, 2010; BAPTISTELLA, 2009, PRATO, 2010). Todos esses autores citados acima utilizaram a técnica para estudos relacionados à determinação de castas, produção de rainhas e determinação de quantidade de alimento larval.

No Brasil, são encontrados três estudos relacionados com a utilização da técnica de criação *in vitro* para avaliar efeito tóxico em crias de abelhas indígenas. Carvalho *et al.* (2003) e Souza *et al.* (2006) realizaram experimentos em condições de laboratório e revelaram a toxicidade do barbatimão (*S. polyphyllum* e *S. adstringens*) para *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona postica*, respectivamente. Siqueira (2008) utilizou a técnica para avaliar o efeito da toxina Cry1Ac do *B. thuringiensis* em larvas de *Trigona spinipes*.

A técnica de criação *in vitro* de abelhas africanizadas e indígenas é muito importante para testar o efeito tóxico de substâncias nas crias. Apesar de algumas substâncias apresentarem baixa toxicidade para as abelhas adultas, elas podem ser altamente tóxicas para as crias e com isso acabam prejudicando a colônia; provocando uma redução na população de abelhas adultas e, conseqüentemente reduzindo a produção de mel e outros produtos, bem como o número de agentes polinizadores. Além disso, testes em condições naturais são muito variáveis devido ao comportamento higiênico das abelhas adultas, pois na maioria dos casos as abelhas removem as crias inoculadas. Também não podemos afirmar que a larva inoculada consumiu todo o material introduzido, pois a abelha adulta pode ingeri-lo. Segundo Carreck (2010), é importante demonstrar a necessidade de estudos em condições controladas para avaliar se plantas que parecem ser tóxicas para abelhas, realmente são tóxicas na prática.

O primeiro trabalho desenvolvido no Brasil utilizando criação de larvas *in vitro*, para demonstrar a toxidade de uma planta, citada pelos apicultores com possibilidade de ser responsável por perdas de colônias de *A. mellifera*, foi desenvolvido por Carvalho (1998). Essa autora demonstrou que a CEB ocorria no mesmo período de florescimento do barbatimão (*S. polyphyllum*) e que fornecendo pólen dessa planta na dieta de larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro*, os sintomas observados nas crias em condições naturais, foram reproduzidos em condições de laboratório. Posteriormente, Santos (2000) utilizou extrato etanólico do pólen e da inflorescência de *S. polyphyllum* adicionados à dieta utilizada para alimentar larvas de *A. mellifera*, também observou os sintomas da CEB. Para as abelhas sem ferrão foram realizados 2 experimentos em condições de laboratório e revelaram a toxidade de *S. polyphyllum* e *S. adstringens* para *M. quadrifasciata* e *S. postica*, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2006).

No entanto, não existe nenhum estudo sobre a toxicidade de *S. polyphyllum* para as larvas de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*. Além disso, para *A. mellifera* foram avaliados os extratos etanólico e hexânico da inflorescência de *S. polyphyllum* (SANTOS, 2000), não existindo nenhum outro estudo abrangendo outras frações obtidas da inflorescência ou de outras partes dessa planta.

2 - OBJETIVOS

- avaliar o efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula*, *N. testaceicornis* e *A. mellifera* criadas *in vitro*;
- avaliar o efeito das frações obtidas dos extratos de inflorescência aberta, inflorescência fechada e da casca de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas de abelhas *A. mellifera* criadas *in vitro*;
- avaliar o efeito da fração hidroetanólica obtida do extrato de inflorescência aberta de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* criadas *in vitro*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Criação *in vitro* - meliponíneos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* mantidas em caixas de madeira para criação racional no meliponário do Departamento de Genética da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto -USP. Estas colônias foram utilizadas para coleta de alimento larval e favos de cria com células recém-operculadas contendo ovos. As colônias foram escolhidas com base na quantidade de potes de alimento, no número de operárias em atividade, no número de favos de cria e que não apresentavam falhas nesses favos.

3.1.1 - Coleta e estocagem do alimento larval

Para a coleta do alimento larval foram retirados discos de cria recém operculados contendo ovos em seu interior, estas células foram facilmente identificáveis, pois possuíam coloração mais escura que as demais e, geralmente, se concentravam na porção superior da área de cria. Os discos de crias retirados dos ninhos foram colocados em placas de Petri, conduzidos ao laboratório e, em condições assépticas, foram desoperculados para a remoção dos ovos, utilizando-se um estilete de ponta fina. Imediatamente após, o alimento larval de cada célula foi coletado utilizando-se uma micropipeta, acondicionado em tubos eppendorf devidamente identificados e conservado em freezer à - 20°C, até a sua utilização.

3.1.2 - Adição de pólen de *S. polyphyllum* ao alimento larval

O alimento larval, previamente coletado (item 3.1.1), foi descongelado à temperatura ambiente e homogeneizado com o auxílio de um agitador elétrico. O pólen de *S. polyphyllum* foi coletado do pote de uma colônia de *S.aff. depilis*, que estava em Altinópolis/SP para estudo sobre coleta desse pólen por abelhas sem ferrão.

Para testar se o pólen de *S. polyphyllum* era tóxico para as crias de *S. aff. depilis* ele foi incorporado ao alimento larval nas seguintes proporções: 1%, 2% e 3%. Para *T. angustula* e *N. testaceicornis* foi adicionado somente 1% ao alimento larval, pois não coletamos outras amostras contendo quantidades elevadas desse pólen.

3.1.3 - Técnica de Criação *in vitro*

Foi utilizada a técnica descrita por Camargo (1972) com modificações sugeridas por Menezes (2010). Porém, ao invés de serem usados alvéolos de cera ou placas de Elisa (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) foram utilizadas placas de acrílico confeccionadas na Oficina de Precisão da USP-RP. Para a criação de larvas de *S. aff. depilis* foi utilizada uma placa de acrílico semelhante à utilizada por Prato (2010), contendo 100 células com 4 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade (Figura 1). Para a criação de larvas de *T. angustula* e *N. testaceicornis* foram utilizadas placas semelhantes, porém com orifícios medindo 3 mm de diâmetro e 7mm de profundidade.

Os experimentos foram montados da seguinte maneira:

3.1.4 - Experimento 1 – Criação *in vitro* para avaliar o efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de *S. aff. depilis*

Foram utilizadas 4 placas de acrílico contendo 10 ovos por tratamento (total de 40 ovos por tratamento), sendo que em cada placa foram realizados 4 tratamentos, conforme citado abaixo:

T1 = 10 ovos foram transferidos para células contendo somente alimento larval (controle);

T2 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 1% de pólen de barbatimão;

T3 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 2% de pólen de barbatimão;

T4 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 3% de pólen de barbatimão.

Logo, foram realizadas 4 repetições totalizando 160 ovos transferidos.

O alimento larval foi distribuído com micropipeta nas células das placas de acrílico esterilizadas na quantidade de 32 µl por célula. Este volume foi utilizado, pois foi o volume médio de alimento encontrado nas células de operárias de *S. aff. depilis* por Menezes (2010). As leituras da taxa de mortalidade foram realizadas diariamente e as crias mortas foram removidas para evitar contaminação de fungos.

3.1.5 - Experimento 2 – Criação *in vitro* para avaliar o efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de *T. angustula*

Foram utilizadas 4 placas de acrílico contendo 10 ovos por tratamento (total de 40 ovos por tratamento), sendo que em cada placa foram realizados 2 tratamentos, conforme citado abaixo:

T1 = 10 ovos foram transferidos para células contendo somente alimento larval (controle);

T2 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 1% de pólen de barbatimão.

Logo, foram realizadas 4 repetições totalizando 80 ovos transferidos.

O alimento larval foi distribuído com micropipeta nas células das placas de acrílico esterilizadas, na quantidade de 10 µl por célula. Este volume foi utilizado, pois foi o volume médio de alimento encontrado nas células de operárias de *T. angustula* (Castro, comun. pessoal). As leituras da taxa de mortalidade foram realizadas diariamente e as crias mortas foram removidas para evitar contaminação de fungos.

3.1.6 - Experimento 3 – Criação *in vitro* para avaliar o efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de *N. testaceicornis*

Foram utilizadas 4 placas de acrílico contendo 10 ovos por tratamento (total de 40 ovos por tratamento), sendo que em cada placa foram realizados 2 tratamentos, conforme citado abaixo:

T1 = 10 ovos foram transferidos para células contendo somente alimento larval (controle);

T2 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 1% de pólen de barbatimão.

Logo, foram realizadas 4 repetições totalizando 80 ovos transferidos.

O alimento larval foi distribuído com micropipeta nas células das placas de acrílico esterilizadas na quantidade de 13 µl por célula. Este volume foi utilizado, pois foi o volume médio de alimento encontrado nas células de operárias de *N. testaceicornis* (Castro, comun. pessoal). As leituras da taxa de mortalidade foram realizadas diariamente e as crias mortas foram removidas para evitar contaminação de fungos.

Os ovos utilizados nos experimentos foram provenientes de favos de cria que foram desoperculados e com o auxílio de um alfinete entomológico dobrado na ponta em ângulo reto foram retirados e colocados sobre o alimento de cada célula. Nesta transferência foi preciso extrema acuidade manual para que os ovos retirados das células naturais fossem colocados no centro das células das placas de acrílico, evitando que os mesmos inclinassem e submergissem no alimento. Após a transferência dos ovos, as placas foram acondicionadas no interior de recipientes plásticos com tampa de fechamento hermético (*Tupperware*). Os recipientes foram envolvidos com filme de PVC e mantidos em estufa BOD a 28°C e 100% de umidade relativa durante a fase alimentar. A manutenção da umidade em 100% foi conseguida por meio de um pequeno vasilhame, contendo água destilada, colocado

juntamente com as placas. Após a fase alimentar a umidade foi mantida a 75% até as abelhas emergirem. A umidade a 75% foi conseguida mediante substituição da água por uma solução supersaturada de NaCl (MENEZES, 2010; PRATO, 2010).

Figura 1 – Placa de acrílico utilizada para a criação *in vitro* de larvas de *S. aff. depilis*.

3.2 - Criação *in vitro* – *A. mellifera*

3.2.1 - Preparo das Dietas

As dietas foram preparadas utilizando-se a metodologia segundo Rembold e Lackner (1981), modificada por Silva (1995), sendo esta dieta chamada de Dieta Controle (DC), a qual tem a seguinte constituição: 49% de geléia real, 36,3% de água destilada, 6,8% de d- frutose, 6,8% de d- glicose e 1,1% de extrato de lêvedo.

Carvalho (1998) realizou testes de toxicidade do pólen de *S. polyphyllum* para as larvas de *A. mellifera* e acrescentou 1% desse pólen à Dieta Controle (DC); sendo esta dieta utilizada no 3º, 4º e 5º dia da alimentação larval.

As quantidades utilizadas para criar 10 larvas foram as seguintes:

1,35 g de geléia real; 0,1860 g de d- glicose; 0,1860 g de d-frutose;
0,0315 g de extrato de lêvedo; 1 ml de água destilada estéril.

As outras dietas foram preparadas adicionando-se 1%, 2% e 3% do pólen de barbatimão (o mesmo pólen utilizado na criação de *S. aff depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*) à DC.

3.2.2 - Experimento 4 - Criação *in vitro* para avaliar o efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de *A. mellifera*

Para realização deste experimento foram utilizadas larvas de *A. mellifera* obtidas de um favo de cria de uma colônia do Apiário do Departamento de Genética da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.2.3 - Técnica de criação *in vitro* – *A. mellifera*

As larvas foram criadas em laboratório utilizando a técnica descrita por Silva (1995) e Silva *et al.* (2005, 2009). Larvas com menos de 24 horas de idade foram transferidas para

células artificiais (cúpulas de cera) e colocadas sobre 4 µl de dieta. As cúpulas foram colocadas sobre um disco de isopor perfurado e dentro de uma placa de Petri (10 cúpulas/placa). Foram transferidas 160 larvas sendo que:

40 larvas (Tratamento 1) – receberam a dieta controle (DC) até o último dia de alimentação;

40 larvas (Tratamento 2) – receberam a dieta controle (DC) até o segundo dia de alimentação e após receberam a dieta com 1% de pólen;

40 larvas (Tratamento 3) - receberam a dieta controle (DC) até o segundo dia de alimentação e após receberam a dieta com 2% de pólen;

40 larvas (Tratamento 4) - receberam a dieta controle (DC) até o segundo dia de alimentação e após receberam a dieta com 3% de pólen.

As larvas foram alimentadas diariamente por cinco dias consecutivos com 4, 15, 25, 50 e 70 µl das dietas (SILVA *et al.* 2005, 2009). As larvas foram submetidas às dietas com pólen após o segundo dia de alimentação, pois é a partir deste dia que elas passam a receber esse alimento quando estão se desenvolvendo nas condições naturais das colônias. Todas as placas de Petri contendo as larvas foram mantidas em uma estufa BOD com temperatura de 34°C e umidade de 96%. Após o período de alimentação elas foram mantidas nas mesmas condições, porém com umidade de 70%. O desenvolvimento foi acompanhado diariamente até a emergência dos adultos com o objetivo de verificar alguma anormalidade das crias. As leituras da taxa de mortalidade foram realizadas diariamente e as crias mortas foram removidas para evitar contaminação de fungos.

3.3 - Obtenção do material vegetal de *S. polyphyllum*

As cascas do caule e as inflorescências com flores abertas e fechadas de *S. polyphyllum* foram coletadas em dezembro de 2009 no Apiário Experimental, no município de Altinópolis, São Paulo.

3.3.1 - Preparação dos extratos brutos

Os extratos brutos foram preparados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química da Universidade de São Carlos (UFSCAR). As cascas e as inflorescências abertas e fechadas foram secas em estufa de circulação à 40°C durante aproximadamente 5 dias (inflorescências) e 10 dias (casca). As cascas foram posteriormente trituradas em moinho. Após esta etapa tanto as inflorescências quanto a casca foram retrituras no Ultra-Turrax (IKA-T25), utilizando o etanol como solvente, a fim de otimizar a extração. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo.

3.3.2 - Fracionamento dos extratos brutos

Parte dos extratos brutos das cascas do caule e das inflorescências com flores abertas e fechadas de *S. polyphyllum* foram fracionados através de uma partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila os quais deram origem a quatro partições do extrato (FLUXOGRAMA 1). As partições resultantes foram concentradas sob vácuo em evaporador rotativo e a completa secagem do material foi obtida através do seu armazenamento em vidros sob capela de exaustão de gases à temperatura ambiente. Em seguida os vidros foram armazenados em geladeira. Estas partições foram submetidas a ensaios por ingestão utilizando-se larvas de abelhas.

FLUXOGRAMA 1 - Metodologia utilizada na partição do extrato de *S. polyphyllum*.

3.4 - Experimento 5 - efeito das frações obtidas dos extratos de inflorescência aberta, inflorescência fechada e da casca de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas de abelhas *A. mellifera* criadas *in vitro*

Os ensaios de ingestão com as larvas de *A. mellifera* foram realizados no Laboratório de Sanidade Apícola, Pindamonhagaba/SP. A atividade das frações obtidas frente às larvas foi realizada por ingestão do material vegetal incorporado na dieta artificial (dieta controle - DC). Foram utilizadas as seguintes quantidades da DC para criar 10 larvas:

1,35 g de geléia real; 0,1860 g de d- glicose; 0,1860 g de d-frutose;
0,0315 g de extrato de levedo; 1 ml de água destilada estéril.

As outras dietas foram preparadas adicionando-se a DC:

0,012%, 0,12% e 1,2% da fração hidroetanólica e acetato de etila - obtidas da flor aberta;
0,12% e 1,2% da fração diclorometano e hexano - obtidas da flor aberta;
0,012%, 0,12% e 1,2% da fração hidroetanólica e acetato de etila - obtidas da flor fechada;
0,12% e 1,2% da fração diclorometano e hexano - obtidas da flor fechada;
0,08%, 0,12% e 1,2% das 4 frações obtidas da casca (hidroetanólica, acetato de etila, diclorometano e hexano).

Logo, foram preparadas 32 dietas contendo as frações de *S. polyphyllum* para serem oferecidas para as larvas. Foi utilizada a técnica de criação descrita anteriormente no item 3.3.3. As larvas com menos de 24 horas de idade foram transferidas a partir dos quadros de colônia pertencente ao apiário (APTA) para as células artificiais (cúpulas de polietileno). As cúpulas foram colocadas sobre um disco de isopor perfurado e dentro de uma placa de Petri (10 cúpulas/placa). Para a realização deste experimento utilizou-se a seguinte metodologia:

Tratamento 1 - Controle – recebeu a dieta controle (DC) sem incorporação dos extratos até o último dia de alimentação;

Tratamento 2 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,012% da fração hidroetanólica da inflorescência aberta;

Tratamento 3 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hidroetanólica da inflorescência aberta;

Tratamento 4 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hidroetanólica da inflorescência aberta;

Tratamento 5 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,012 da fração acetato de etila da inflorescência aberta;

Tratamento 6 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração acetato de etila da inflorescência aberta;

Tratamento 7 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração acetato de etila da inflorescência aberta;

Tratamento 8 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração diclorometano da inflorescência aberta;

Tratamento 9 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração diclorometano da inflorescência aberta;

Tratamento 10 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hexano da inflorescência aberta;

Tratamento 11 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hexano da inflorescência aberta;

Tratamento 12 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,012% da fração hidroetanólica da inflorescência fechada;

Tratamento 13 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hidroetanólica da inflorescência fechada;

Tratamento 14 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hidroetanólica da inflorescência fechada;

Tratamento 15 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,012 da fração acetato de etila da inflorescência fechada;

Tratamento 16 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração acetato de etila da inflorescência fechada;

Tratamento 17 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração acetato de etila da inflorescência fechada;

Tratamento 18 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração diclorometano da inflorescência fechada;

Tratamento 19 – recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração diclorometano da inflorescência fechada;

Tratamento 20 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hexano da inflorescência fechada;

Tratamento 21 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hexano da inflorescência fechada;

Tratamento 22 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,08% da fração hidroetanólica da casca;

Tratamento 23 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hidroetanólica da casca;

Tratamento 24 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hidroetanólica da casca;

Tratamento 25 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,08% da fração acetato de etila da casca;

Tratamento 26 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração acetato de etila da casca;

Tratamento 27 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração acetato de etila da casca;

Tratamento 28 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,08% da fração diclorometano da casca;

Tratamento 29 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração diclorometano da casca;

Tratamento 30 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração diclorometano da casca;

Tratamento 31 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,08% da fração hexano da casca;

Tratamento 32 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 0,12% da fração hexano da casca;

Tratamento 33 - recebeu a DC até o segundo dia de alimentação e após recebeu a dieta com incorporação de 1,2% da fração hexano da casca.

Para cada tratamento foram realizadas 2 repetições, logo foram transferidas 660 larvas.

As dietas foram fornecidas a cada dia do desenvolvimento larval (4 µl no primeiro dia; 15 µl

no segundo; 25 µl no terceiro, 50 µl no quarto e 70 µl no quinto dia) utilizando-se micropipeta de repetição e volume variável - Gilson. Durante o período de alimentação e defecação as placas de Petri permaneceram dentro de uma estufa incubadora (BOD) a 34°C e 96% de umidade relativa. Após defecarem os indivíduos sobreviventes foram mantidos sob as mesmas condições anteriores, porém com 70% de umidade relativa. As larvas foram observadas diariamente e anotadas as alterações de coloração, desenvolvimento e o número de indivíduos mortos a cada 24 horas. Dessa forma, foi calculada a porcentagem de crias vivas, comparando o resultado ao grupo controle.

3.5 - Experimento 6 - efeito da fração hidroetanólica do extrato da inflorescência aberta de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* criadas *in vitro*

Para testar se a fração hidroetanólica de *S. polyphyllum* apresentava toxicidade para as crias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*, ela foi incorporado ao alimento larval, previamente coletado (item 3.1.1) e descongelado, nas seguintes proporções: 1%, 2% e 3%.

Foram realizadas 2 repetições por tratamento, sendo que, em cada placa foram realizados 4 tratamentos, conforme citado abaixo:

T1 = 10 ovos foram transferidos para células contendo somente alimento larval (controle);

T2 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 1% da fração hidroetanólica;

T3 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 2% da fração hidroetanólica;

T4 = 10 ovos foram transferidos para células contendo alimento larval + 3% da fração hidroetanólica.

Logo, foram transferidos 80 ovos de cada espécie de abelha para a realização dos tratamentos. O alimento larval foi distribuído com micropipeta nas células das placas de acrílico esterilizadas na quantidade de 32, 10 e 13 µl por célula para *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis*, respectivamente. As leituras da taxa de mortalidade foram realizadas diariamente e as crias mortas foram removidas para evitar contaminação de fungos.

3.6 – Análise estatística

Para verificar se as dietas que foram ingeridas pelas larvas influenciaram na sobrevivência das crias foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). O programa SAS foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

4 - RESULTADOS

Efeito do pólen de barbatimão (coletado por *S. aff. depilis*) no desenvolvimento de larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula*, *N. testaceicornis* e *A. mellifera* criadas *in vitro*

A sobrevivência das larvas das abelhas criadas *in vitro* variou entre os tratamentos (ANOVA, $F= 172,12$; $R^2= 0,98$; $p < 0.0001$). Os resultados dos experimentos mostraram que para *A. mellifera* os tratamentos realizados com as dietas contendo 1, 2 e 3% do pólen de barbatimão foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p<0,05$). A sobrevivência das crias foi significativamente maior quando as larvas ingeriram apenas a dieta controle do que quando se alimentaram com as dietas contendo o pólen de barbatimão (Figura2, Tabela 1). As crias que receberam as dietas contendo 1, 2 e 3 % de pólen de barbatimão morreram todas na fase de larva pós defecante (pré pupas) e com os sintomas da CEB, ou seja, apresentando acúmulo de líquido ecdisial (Figura 3).

Para *S. aff. depilis* os tratamentos realizados com o alimento contendo 1, 2 e 3% do pólen de barbatimão não foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p>0,05$). Portanto a sobrevivência das crias não foi afetada quando ingeriram o alimento contendo o pólen de barbatimão (Figuras 2 e 4, Tabela 1).

Para *T. angustula* o tratamento realizado com o alimento contendo 1% do pólen de barbatimão foi estatisticamente diferente do controle (Tukey, $p<0,05$). A sobrevivência das crias foi significativamente maior quando as larvas ingeriram apenas o alimento - controle do que quando se alimentaram com o alimento contendo 1% do pólen de barbatimão (Figura2, Tabela 1). As crias que receberam o alimento contendo 1% de pólen de barbatimão morreram apresentando coloração escura; sendo algumas antes de defecarem e as outras após defecarem.

Para *N. testaceicornis* o tratamento realizado com o alimento contendo 1% do pólen de barbatimão não foi estatisticamente diferente do controle (Tukey, $p>0,05$). Portanto a sobrevivência das crias não foi afetada quando ingeriram o alimento contendo o pólen de barbatimão (Figura 2, Tabela 1); fato semelhante ao encontrado para *S. aff. depilis*.

Figura 2 – Sobrevivência das crias de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* alimentadas com diferentes concentrações de pólen de barbatimão.

Sendo: C= dieta pura - controle

P1= dieta com 1% de pólen de barbatimão

P2= dieta com 2% de pólen de barbatimão

P3= dieta com 3% de pólen de barbatimão

Tabela 1 – Sobrevivência média (%) de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* alimentadas com dieta pura, dieta com 1% de pólen de barbatimão, dieta com 2% de pólen de barbatimão e com 3% de pólen de barbatimão.

Espécie	Dieta pura (controle)	Dieta com 1% pólen	Dieta com 2% pólen	Dieta com 3% pólen
<i>A. mellifera</i>	92,5 a	0 b	0 b	0 b
<i>S. aff. depilis</i>	90 a	87,5 a	92,5 a	90 a
<i>T. angustula</i>	70 a	20 b	–	–
<i>N. testaceicornis</i>	90 a	87,5 a	–	–

As médias seguidas com a mesma letra nas linhas não diferem a $P < 0,05$, pelo teste de Tukey.

Figura 3 – A = Pupas de *A. mellifera* alimentadas com a dieta sem pólen de barbatimão (controle); B = pré pupas alimentadas com dieta contendo 1% de pólen de barbatimão (apresentando acúmulo de líquido ecdisial).

Figura 4 – Pupas de *S. aff. depilis* alimentadas durante a fase larval com pólen de barbatimão.

Efeito das frações obtidas dos extratos de inflorescência aberta, inflorescência fechada e da casca de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas de abelhas *A. mellifera* criadas *in vitro*

A sobrevivência das larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro* variou entre os tratamentos (ANOVA, $F= 13,07$; $R^2= 0,92$; $p < 0.0001$).

Os resultados dos experimentos mostraram que os tratamentos realizados com as dietas contendo as frações H1 (Hidroetanólica 0,012%), H2 (Hidroetanólica 0,12%), A1 (Acetato 0,012%), A2 (Acetato 0,12%), D2 (Diclorometano 0,12%) e HX2 (Hexano 0,12%) obtidas do extrato da inflorescência aberta não foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p>0,05$); portanto não afetaram a sobrevivência das crias devido ao fato de conterem menores concentrações dessas frações (Figura 5). Os tratamentos realizados com as dietas contendo as frações H3 (Hidroetanólica 1,2%), A3 (Acetato de etila 1,2%), D3 (Diclorometano 1,2%) e HX3 (Hexano 1,2%) obtidas do extrato da inflorescência aberta foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p<0,05$). A fração hidroetanólica adicionada à dieta na concentração de 1,2% (H3) causou a mortalidade das crias na fase de larva pós defecante (pré pupas, Figura 6) e todas morreram com sintomas característicos da CEB. As frações acetato de etila, diclorometano e hexano adicionadas à dieta na concentração de 1,2% (A3, D3 e HX3, respectivamente) causaram mortalidade das larvas ainda na fase de alimentação, todas morreram pequenas e sem ingerir todo o alimento.

Para os experimentos realizados com as frações obtidas do extrato da inflorescência fechada os resultados revelaram que as frações H3 (Hidroetanólica 1,2%), A3 (Acetato de etila 1,2%), D3 (Diclorometano 1,2%) e H3 (Hexano 1,2%) foram altamente tóxicas para as larvas, pois todas morreram pequenas e sem ingerir todo o alimento (Figura 7).

Figura 5 – Sobrevivência das crias de *A. mellifera* alimentadas com a dieta pura - controle (C) e com as dietas contendo 0,012% (1), 0,12% (2) e 1,2% (3) das frações hidroetanólica (H), acetato de etila (A), diclorometano (D) e hexano (HX) obtidas do extrato da inflorescência aberta.

Figura 6 – Sobrevivência das crias de *A. mellifera* na fase de larva pré defecante (S1), larva pós defecante (S2) e na fase de pupa (S3) alimentadas com a dieta pura - controle (C) e com as dietas contendo 0,012% (1), 0,12% (2) e 1,2% (3) da fração hidroetanólica (H) obtida do extrato da inflorescência aberta.

Figura 7 - Sobrevivência das crias de *A. mellifera* alimentadas com a dieta pura - controle (C) e com as dietas contendo 0,012% (1), 0,12% (2) e 1,2% (3) das frações hidroetanólica (H), acetato de etila (A), diclorometano (D) e hexano (HX) obtidas do extrato da inflorescência fechada.

Para os experimentos realizados com as frações obtidas do extrato da casca do caule de *S. polyphyllum* os resultados revelaram que apenas as frações hidroetanólica e acetato de etila adicionadas à dieta na concentração de 0,08% não afetaram a sobrevivência das crias de *A. mellifera*. Essas mesmas frações quando utilizadas nas concentrações de 0,12% e 1,2% reduziram a sobrevivência, fazendo com que as larvas morressem na fase alimentar e sem ingerir todo o alimento. As frações diclorometano e hexano foram tóxicas para as larvas em todas as concentrações testadas (Figura 8).

Figura 8 - Sobrevivência das crias de *A. mellifera* alimentadas com a dieta pura – controle (C) e com as dietas contendo 0,012% (1), 0,12% (2) e 1,2% (3) das frações hidroetanólica (H), acetato de etila (A), diclorometano (D) e hexano (HX) obtidas do extrato da casca.

Efeito da fração hidroetanólica obtida do extrato da inflorescência aberta de *S. polyphyllum* no desenvolvimento de larvas das abelhas *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* criadas *in vitro*

A sobrevivência das larvas das abelhas criadas *in vitro* variou entre os tratamentos (ANOVA, $F = 125,19$; $R^2 = 0,99$; $p < 0,0001$). Os resultados dos experimentos mostraram que para *S.aff. depilis* os tratamento realizados com as dietas contendo 2 e 3% da fração hidroetanólica foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p < 0,05$). A sobrevivência das crias foi significativamente maior quando as larvas ingeriram o alimento larval (controle) e o alimento larval contendo apenas 1% da fração, do que quando se alimentaram com o alimento larval contendo 2 e 3% (Tabela 2, Figura 9). As crias que receberam o alimento contendo 2 e 3 % da fração hidroetanólica morreram na fase de larva pré defecante e sem ingerir todo o alimento (Figura 10).

Para *T. angustula* os tratamentos realizados com o alimento contendo 2 e 3% da fração hidroetanólica foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p < 0,05$). A sobrevivência das crias foi significativamente maior quando as larvas ingeriram o alimento larval (controle) do que quando ingeriram o alimento contendo 2 e 3% da fração (Tabela 2, Figura 9). As crias que receberam o alimento contendo 2 e 3 % da fração hidroetanólica morreram na fase de larva pré defecante (sem ingerir todo o alimento) e também na fase de larva pós defecante (pré pupas).

Para *N. testaceicornis* os tratamentos realizados com o alimento contendo 1, 2 e 3% da fração hidroetanólica não foram estatisticamente diferentes do controle (Tukey, $p > 0,05$), portanto a sobrevivência das crias não foi afetada quando ingeriram o alimento contendo 1, 2 e 3% da fração (Tabela 2, Figura 9).

Tabela 2 – Sobrevivência média (%) de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* alimentadas com alimento larval puro (controle), alimento com 1% da fração hidroetanólica (H1), alimento com 2% da fração hidroetanólica (H2) e com 3% da fração hidroetanólica (H3).

Espécie	Controle	H1	H2	H3
<i>S. aff. depilis</i>	95 a	90 a	0 b	0 b
<i>T. angustula</i>	75 a	45 a b	30 b	20 b
<i>N. testaceicornis</i>	90 a	85 a	95 a	90 a

As médias seguidas com a mesma letra nas linhas não diferem a $P < 0,05$, pelo teste de Tukey.

Figura 9 – Sobrevivência das crias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* alimentadas com alimento larval puro – controle (C), alimento larval com 1% da fração hidroetanólica (H1), alimento larval com 2% da fração hidroetanólica (H2) e alimento larval com 3% da fração hidroetanólica (H3).

Figura 10 - Placa de criação *in vitro* de *S. aff. depilis* com alta taxa de sobrevivência na fase de pupas (SC e S1) e mortas no início da fase larval (S2 e S3), onde: SC= controle, alimentadas com o alimento larval;
S1= alimento larval + 1% da fração hidroetanólica;
S2= alimento larval + 2% da fração hidroetanólica;
S3= alimento larval + 3% da fração hidroetanólica.

5 - DISCUSSÃO

As crias de *A. mellifera* alimentadas com a dieta contendo o pólen de barbatimão, que foi coletado de uma colônia de *S. aff. depilis*, morreram todas com os sintomas característicos da CEB. Porém, nas concentrações testadas o mesmo não foi observado para *S. aff. depilis* e *N. testaceicornis*, pois não causou mortalidade das crias dessas abelhas em condições de laboratório. Entretanto, as crias de *T. angustula* foram afetadas quando alimentadas com 1% desse pólen, sendo que as larvas que apresentaram mortalidade na fase pós defecante apresentaram sintomas semelhantes aos observados em condições de campo, conforme ilustrado no Capítulo 2 desse trabalho.

Carvalho (1998) realizou a criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera* e ao adicionar na dieta 1% do pólen de barbatimão, retirado de coletores instalados em colméias de *A. mellifera*, verificou a mortalidade de crias com os sintomas da CEB. Os nossos resultados também revelaram esses mesmos sintomas, porém com a utilização do pólen retirado do pote de armazenamento de uma colônia de *S. aff. depilis*.

Alves (2010b) concluiu que o pólen de *Azadirachta indica* (nim) é prejudicial às crias de *A. mellifera*, causando efeito nocivo e até mesmo letal às larvas desenvolvidas em laboratório à medida que se aumenta a sua participação na dieta. O pólen de outras espécies de plantas é citado como sendo tóxico para abelhas adultas e possivelmente pode apresentar alguma toxicidade para as larvas.

Em relação aos testes contendo as diferentes frações obtidas do extrato da inflorescência aberta, a fração hidroetanólica foi a única que manifestou os sintomas da CEB nas crias de *A. mellifera*, quando adicionada a 1,2% na dieta. Essa mesma concentração das frações acetato de etila, diclorometano e hexano, também causou a mortalidade das crias de *A. mellifera*, porém todas morreram na fase de larva pré defecante, sem ingerir todo o alimento

necessário para o seu desenvolvimento, indicando um efeito letal dessas frações para as larvas. Para *N. testaceicornis* a fração hidroetanólica não apresentou nenhum efeito letal em todas as concentrações que foram testadas. Entretanto para *S. aff. depilis* ela foi tóxica nas concentrações de 2 e 3%. Para *T. angustula*, também foi tóxica nessas 2 concentrações, porém algumas crias morreram na fase de larva pós defecante, diferentemente do observado para *S. aff. depilis* que morreram todas na fase de larva pré defecante.

Santos (2000) realizou ensaios biológicos com os extratos hexânico e etanólico do pólen e da inflorescência de *S. polyphyllum* e verificou pré pupas com sintomas da CEB nos tratamentos em que as larvas foram alimentadas com dieta contendo o extrato etanólico. Esse mesmo autor, também determinou a presença de 7,91% de taninos no extrato etanólico do pólen e 21,43% de taninos no extrato etanólico da inflorescência; o que levou a concluir que o constituinte químico responsável pelos sintomas da CEB está presente na fração etanólica do pólen e pode pertencer ao grupo dos taninos. Os taninos têm sido apontados como sendo redutores digestivos e redutores de crescimento para alguns insetos. Cavalcante et al (2006) relataram que algumas espécies vegetais que apresentavam altas concentrações de tanino causaram maiores índices de mortalidade nas fases jovens de *Bemisia tuberculata* (mosca-branca).

Diante dos nossos resultados é lícito admitir que apenas a fração hidroetanólica da inflorescência aberta adicionada à dieta na concentração de 1,2% apresentou os resultados considerados positivos para *A. mellifera*, isto é, mortalidade na fase de pré-pupa com sintomas semelhantes aos observados em condições naturais. Isto demonstra que o constituinte químico responsável pelos sintomas da CEB esta presente na fração hidroetanólica da inflorescência aberta de *S. polyphyllum* e se mostra necessário fracionar e identificar os compostos ativos para afirmar se realmente pertence ao grupo dos taninos, conforme sugerido por Santos (2000).

Para *A. mellifera* verificamos em laboratório os mesmos sintomas da CEB observados em condições de campo, quando adicionamos 1,2% da fração hidroetanólica à dieta; porém quando adicionamos 1% dessa mesma fração ao alimento dos meliponíneos a sobrevivência das crias não foi afetada. Para *T. angustula* conseguimos observar algumas crias mortas com sintomas semelhantes aos observados em condições de campo, quando adicionamos 2 e 3% dessa mesma fração ao alimento larval. Deste modo, parece lógico concluir que essas abelhas apresentam diferenças na susceptibilidade aos efeitos tóxicos do barbatimão.

Cintra et al. (2003) realizaram testes com a inflorescência desidratada de *S. adstringens* incorporada ao alimento oferecido para as abelhas adultas de *A. mellifera* e *Scaptotrigona postica*, resultando em uma toxicidade maior para *A. mellifera* do que para *S. postica*. Cintra et al. (2009) comentam que essa diferença na susceptibilidade encontrada entre as abelhas poderia ser explicado pelo fato da *A. mellifera* ser uma abelha introduzida no Brasil, enquanto as outras são nativas. Isso às levaria a serem mais adaptadas a essas plantas.

Essa diferença de susceptibilidade entre as abelhas africanizadas e indígenas também foi encontrada por Xavier (2009) ao realizar testes com os inseticidas botânicos rotenona, andiroba, extrato de alho e óleos de neem, citronela e eucalipto sobre *A. mellifera*, *N. testaceicornis* e *T. angustula*. Os resultados obtidos demonstraram que para as larvas de *A. mellifera* criadas in vitro os óleos de neem, de citronela e a rotenona foram tóxicos. Encontrou que para as abelhas adultas de *A. mellifera* o inseticida mais tóxico foi o óleo de neem e o menos tóxico foi o óleo de andiroba. Para *T. angustula* o óleo de citronela foi o mais tóxico enquanto que a rotenona não foi tóxica. Porém, para *N. testaceicornis* nenhum inseticida botânico estudado apresentou toxicidade.

Malaspina e Stort (1983) encontraram que as abelhas nativas mandaguari (*Scaptotrigona postica*) e mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) foram mais tolerantes do que

A. mellifera ao efeito do DDT 1% aplicado topicamente. De acordo com os resultados obtidos por Del Sarto (2009), *M. quadrifasciata* é altamente susceptível aos inseticidas deltametrina e metamidofós, porém metamidofós foi apenas moderadamente tóxico para *A. mellifera*. Segundo Freitas e Pinheiro (2012) é possível observar uma grande variação na tolerância dos meliponíneos aos pesticidas em função da espécie de abelha estudada. Smirle (1993) citou que em relação aos inseticidas as abelhas mais jovens são mais sensíveis devido a menor quantidade de enzimas detoxificantes. Possivelmente em relação ao pólen ou néctar tóxicos as larvas de diferentes espécies e gêneros de abelhas podem apresentar diferenças na sua susceptibilidade devido a quantidade de enzimas detoxificantes presentes.

Experimentos posteriores devem ser conduzidos com as larvas de *A. mellifera*, *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* utilizando-se o pólen de barbatimão com o intuito de verificar quais são os mecanismos envolvidos nas diferentes susceptibilidades encontradas nesse estudo.

CONCLUSÕES GERAIS

- Encontramos diferenças entre colônias instaladas em um mesmo apiário e entre colônias instaladas em apiários diferentes em relação à coleta de pólen de barbatimão.
- A sobrevivência das crias de *A. mellifera*, devido ocorrência da Cria Ensacada Brasileira (CEB) foi diferente entre as colônias, dependendo da localização do apiário.
- Não observamos resistência larval em relação ao pólen de barbatimão. Para evitar a perda de colônias devido à ocorrência da CEB, devemos selecionar as colônias que apresentem baixa preferência à coleta desse pólen e a instalação das colônias em locais que tenham fontes alternativas de pólen e que floresçam durante o mesmo período do barbatimão.
- As abelhas das colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* coletaram o pólen de barbatimão.
- Em condições de campo colônias de *S. aff. depilis*, *T. angustula* e *N. testaceicornis* apresentaram favos de cria com falhas, células desoperculadas contendo crias mortas e células desoperculadas com crias removidas.
- Durante os três anos consecutivos observamos crias mortas nas colônias dos meliponíneos, porém não ocorreu nenhuma perda dessas colônias; diferentemente do que ocorreu com *A. mellifera*, onde as perdas foram de 100%, conforme a localidade dos apiários.
- As larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro* e que receberam as dietas contendo 1, 2 e 3 % de pólen de barbatimão, retirado do pote de uma colônia de *S. aff. depilis*, morreram todas na fase de larva pós defecante (pré pupas) e com os sintomas da CEB.
- As larvas de *S. aff. depilis* criadas *in vitro* e alimentadas com o alimento larval contendo o pólen de barbatimão, nas mesmas concentrações utilizadas para alimentar as larvas de *A.*

mellifera, desenvolveram-se normalmente até a fase adulta. As larvas de *N. testaceicornis* também desenvolveram normalmente até a fase adulta quando ingeriram o alimento contendo 1% desse pólen. Portanto, as larvas dessas abelhas são fisiologicamente mais resistentes a esse pólen tóxico.

- A sobrevivência das crias de *T. angustula* foi afetada quando ingeriram o alimento contendo 1% do pólen de barbatimão. Algumas crias morreram com sintomas semelhantes aos observados em condições de campo.
- As larva de *A. mellifera* alimentadas com dieta contendo 1,2% da fração hidroetanólica obtida do extrato da inflorescência aberta de *S. polyphyllum* morreram com sintomas da CEB.
- Para *S. aff. depilis* e *T. angustula* a fração hidroetanólica foi tóxica nas concentrações de 2 e 3%.
- Para *N. testaceicornis* a fração hidroetanólica não apresentou nenhum efeito letal para as crias.

REFERÊNCIAS¹

- ALMEIDA, M. G. 1974. **Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha *Melipona scutellaris*, Latreille (1811)**. 1974. 128f. Tese Doutorado - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1974.
- ALMEIDA, S.P.; SANO, S. M. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Brasília, DF: EMPRAPA Cerrado, p. 347-351, 1998.
- ALMEIDA, S. S. M. S. **Estudo químico de plantas com atividade sobre insetos sociais**. 2007. 284f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- ALVES, M. M. B. M.; ALVES JUNIOR, V. V.; LOPES, M. N. T.; CARBONARI, V. Efeito do resíduo de extrato floral de Barbatimão, em soro fisiológico, na longevidade de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1996, Teresina, PI. **Anais...** Teresina, PI, 1996. p. 325.
- ALVES, J. E. Néctar e pólen tóxicos para *Apis mellifera*. In: X CONGRESSO ÍBEROLATINO AMERICANO DE APICULTURA, 2010, Natal, RN. **Anais...** Natal, RN, 2010a. p. 8.
- ALVES, J. E. **Toxicidade do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.: Meliaceae) para *Apis mellifera* e sua importância apícola na caatinga e mata litorânea cearense**. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010b.
- BABENDREIER, D.; KALBERER, N.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; BIGLER, F.. 2004. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v. 35, p. 293-300, 2004.
- BAILEY, L.; BALL, B.V. **Honey bee pathology**. 2nd. London, Academic Press, 1991. 193p.
- BAPTISTELLA, A.R.T.O. **Produção “in vitro” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponina)**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989, 150p.
- BASUALDO, M.; BEDASCARRASBURE, E.; DE JONG, D. Africanized honey bees (Hymenoptera : Apidae) have a greater fidelity to sunflowers than European bees. **J. Econ. Entomology**, v. 93, p. 304-307, 2000.
- BASUALDO, M.; RODRIGUEZ, E.M.; BEDASCARRASBURE, E.; DE JONG, D. Selection and estimation of the heritability of sunflower (*Helianthus annuus*) pollen collection behavior in *Apis mellifera* colonies. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n 2, p. 374-381, 2007.
- BATRA, S.W.T. Bees and pollination in our changing environment. **Apidologie**, v. 26, p. 361-370, 1995.
- BENEDEK, P.; GAAL, E. The effect of insect pollination on the seed onion, with observation on the behavior of honeybees on the crop. **Journal Apicultural Research**, v. 11, n 3, p. 175-180, 1972.

- BEZERRA, J. M. D. 1995. 65f. **Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação - Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- BRITO, M. F.; ARMIÉN, A. G.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 4, p.111-116, 1995.
- BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; SILVA, H. K.; NOGEIRA, M. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. 1. Caracterização do quadro clínico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 9-17, 2001.
- BRODSGAARD, H.F.; BRODSGAARD, C.J.; HANSEN, H.; LOVEI, G. L. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. **Apidologie**, v. 34, p. 139-145, 2003.
- CAMARGO, C. A. Produção “in vitro” de intercastas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). In: **Homenagem a W. E. Kerr**, Rio Claro-SP, Brasil, p. 37-45, 1972.
- CAMARGO, C. A. **Determinação de sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. 1976. 76f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1976.
- CAMPOS, L. A. O.; COSTA, M. A. Determinação do sexo em abelhas XXVIII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae). **Ver. Bras. Biol.**, v. 49, n. 4, p. 999-1001, 1989.
- CARBONARI, V.; ALVES, M. M. B. M.; JUNIOR, V. V. A.; SANTANA, A. G. S. Efeito tóxico dos componentes florais (nectário e antera) do barbatimão em operárias *Apis mellifera* africanizadas (Hym.: Apidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1998, Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA, 1998.
- CARRECK, N. What about toxic pollen and néctar?. **Bee World**, v. 25, p. 75-76, 2010.
- CARVALHO, A.C.P. **Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera* L.** 1998. 58f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.
- CARVALHO, A. C. P.; SILVA, I. C.; MESSAGE, D. Pólen tóxico como causa da Cria Ensacada Brasileira. In: III ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1998, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 1998. p. 277.
- CARVALHO, A. C. P.; CAMPOS, L. A. O.; CARVALHO, G. A. Pólen de barbatimão (*Stryphnodendron sp*) também afeta meliponídeos. **Mensagem Doce**, v. 66, p. 6, 2003.
- CARVALHO, A.C.P.; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) which causes sacbrood-like symptoms. **Apidologie**, v.35, n. 1, p. 89-90, 2004.

- CASTAGNINO, G. L. B. Impacto na Apicultura causado pelo pólen do barbatimão na Zona da Mata Mineira. **Mensagem Doce**, n 73, p. 16-18, 2003.
- CASTAGNINO, G. L. B.; MESSAGE, D.; MARCO JUNIOR, P. Fornecimento de substituto de pólen na redução da mortalidade de *Apis mellifera* L. causada pela Cria Ensacada Brasileira. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1838-1843, 2011.
- CAVALCANTE, G.M. et al. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 9-14, 2006.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Toxicidade de *Stryphnodendron adstringens* e *.Dimorphandra mollis* (barbatimão) em operárias de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1998, Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA, 1998.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Toxicity of Barbatimão to *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*, under laboratory conditions. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 1, p. 9-12, 2003.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas tóxicas para abelhas. **Arq. Inst. Biológico**, v.72, n. 4, p. 547-551, 2005
- COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. 2002. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191p.
- CRUZ, D.O. **Biologia floral e eficiência polinizadora das abelhas *Apis mellifera* L. (campo aberto) e *Melipona quadrifasciata* Lep. (ambiente protegido) na cultura da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) em Minas Gerais, Brasil**. 2009. 88f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- DAG, A.; STERN, R.A.; SHAFIR, S. Honey bee (*Apis mellifera*) strains differ in apple (*Malus domestica*) pollen foraging preference. **Journal of Apicultural Research**, v. 44, n 1, p. 15-20, 2005.
- DEL LAMA, M.A.; PERUQUETTI, R.C. Mortalidade de abelhas visitantes de flores de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Leguminosae) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 4, p. 547-549, 2006.
- DEL SARTO, M.C.L. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 64f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- DOOLITTLE, G.M. G.M. Doolittle's queen rearing methods. **American Bee Journal**, v. 39, p. 435-436, 1899.
- FELFILI, J.M.; SILVA-JUNIOR, M.C.; DIAS, B. J.; REZENDE, V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Bras. Botânica**, v. 22, n. 1, p. 83-89, 1999.
- FREE, J. B.; WILLIAMS, I. H. Genetic determination of honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging preferences. **Ann. Appl. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 137-141, 1973.

- FREITAS, B.M.; PINHEIRO, J.N. **Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: MMA, 2012. 112p.
- GENERSCH, E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 87, p. 87-97, 2010.
- GONÇALVES, L. S; BRITES, J. P. Nota sobre um novo instrumento usado na inseminação de rainhas de hymenopteros. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1970, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, SC, 1970. p. 119-122.
- HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Allometric and multivariate analysis of sex and caste polymorphism in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **Insect. Soc.**, v. 39, p. 251-266, 1992.
- HERZOG-SOARES, J.D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade de tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 12, p. 2-4, 2002.
- HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, n. 29, p.159-172, 1990.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; GONÇALVES, L.S.; JONG, D.; FREITAS, B.M.; CASTRO, M.S.; SANTOS, I.A.; VENTURIERI, G.C. Abelhas e Desenvolvimento Rural no Brasil. **Mensagem Doce**, n 80, 2005.
- JACOBSON, T.K.B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J.B.; FARIAS, J.G.; KLIEMANN, H.J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 1, p. 123-129, 2005.
- KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Ann. Rev. Ent.**, v. 28, p. 407-53, 1983
- KEVAN, P. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Eds). **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Ministry of Environment, 2002, 313p.
- LAIDLAW JR., H. H. **Criação contemporânea de rainhas**. Traduzido por Carlos Alberto Osowski. Canoas: La Salle, 1998. 219p.
- LOCATELLI, J.C. Abelhas como agentes polinizadores. **Informativo Zum-Zum**, p. 20-21, 2010.
- LOPES, G.S.; MARQUES, L.P.; SILVA, J.M.; LEITE, A.M.M. Análise polínica em méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de alguns municípios da região Amazônica maranhense. **Mensagem doce**, n. 95, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512p.
- MACIEL-SILVA, V. L.; KERR, W. E. Sex determination in bees. XXVII. Castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). **Apidol.**, v. 22, n. 1, p. 15-19, 1991.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses? **Aust. J. Agric. Res.**, v. 55, n 7, p. 771-773, 2004.
- MALASPINA, O.; STORT, A.C. DDT tolerance of africanized bees, italian bees and their F1 hybrids (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 56, n.1, p.74-79, 1983.
- MENEZES, C. A. 2006. **Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval**. 2006, 36f. Monografia - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- MENEZES, C. **A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2010. 97f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B.; SAKAMOTO, S. M.; SOTO-BLANCO, B. Toxic evaluation in honey bees (*Apis mellifera*) of pollen from selected plants from the semi-arid region of Brazil. **J. Apic. Res.**, v. 49, n. 3, p. 265-269, 2010.
- MESSAGE, D.; BALL, B. V.; SILVA, I. C. A serious brood disease affecting africanized honeybees (*Apis mellifera*) In: APIMONDIA CONGRESS, 1995, Lausanne. **Proceedings...** Lausanne: Apimondia, 1995, 203p.
- MESSAGE, D.; BALL, B. V.; SILVA, I. C. Estudo epidemiológico de uma doença semelhante a Cria Ensacada na região de Altinópolis/SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1996, Teresina. **Anais...** Teresina, 1996.
- MESSAGE, D. **Management and disease problems of Africanized bees in Brazil**. Parkstone: The Central Association of Beekeepers, 1997. 15p.
- MESSAGE, D.; CARVALHO, A. C. P. ; CAMPOS, L. A. O.; CARVALHO, G. A. Pólen de barbatimão também afeta meliponídeos. **Jornal Eymba Acuay**, v. 3, n 16, p. 2, 1999.
- MESSAGE, D.; SILVA, I. C.; DE JONG, D.; SIMÕES, Z. L. P.; TEIXEIRA, E. W. CCD (Colony Collapse Disorder) ocorre em abelha *Apis mellifera* (africanizadas) no Brasil? Um relato de caso. In: IX ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2010, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP, 2010.
- MICHENER, C.D. 1974. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Massachusetts: Harvard University Press, 1974. 404p.

- MODRO, A. F. H. **Flora e caracterização polínifera para abelhas *Apis mellifera* L. na região de Viçosa, MG.** 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- MODRO, A. F. H. **Influência do pólen sobre o desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.).** 2010, 98F. Tese (Doutorado – Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.
- MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, v.128, p. 1–15, 2000.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A criação das abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae).** São Paulo: Chácara e Quintais, 1970. 365p.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445p.
- NYE, W. P.; MACKENSEN. Preliminary report on selection and breeding of honeybees for alfafa pollen collection. **J. Apic. Res.**, v. 4, p. 43-48, 1965.
- NYE, W. P.; MACKENSEN, O. Selective breeding of honey bees for alfafa pollen collection with tests in high and low alfafa pollen collection regions. **J. Apic. Res.**, v. 9, p. 61-64, 1970.
- OCCHIONI, E. M. L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Bot. Bras.**, v.4, p.153-158, 1990.
- PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA-SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor de tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmaceuticas**, v.10, p. 101-106, 1988.
- PAULA, R. C. **Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta*.** 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2009.
- PRATO, M. **Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** 2010. 114f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- PROCTOR, M.; YEAO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination.** London, Harper Collins Publishers, 1996. 479p.
- REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R. K.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; MELLO, J. C.; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 101-104, 2002.
- REMBOLD, H.; LACKNER, B. Rearing of honeybee larvae in vitro: effect of yeast on queen differentiation. **J. Apic. Res.**, v. 20, p. 165-171, 1981.

- RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxinas que afetam a reprodução em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 63-68, 2007.
- RODRIGUES, F. R. Efeito do extrato aquoso do embrião cotilédone de *Stryphnodendron obovatum* Benth no ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. **Ciência e Cultura**, v. 34, n. 7, p. 906-908, 1982.
- SADEH, A.; SHMIDA, A.; KEASAR, T. The carpenter bee *Xylocopa pubescens* as agricultural pollinator in greenhouses. **Apidologie**, v.38, p. 508-517, 2007.
- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; TOLEDO, C. E. M.; SACRAMENTO, L. V. S.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Estudo comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* – Leguminosae. **Latin Am. J. Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 362-368, 2007.
- SANTORO, K. R.; VIEIRA, M. E. Q.; QUEIROZ, M. L.; QUEIROZ, M. C.; BARBOSA, S. B. P. Efeito do tanino de *Stryphnodendron* spp. sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. **Arch. Zootec.**, v. 53, p. 281–291, 2004.
- SANTOS, M. L. A. **Análise dos constituinte químicos do pólen e da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*, em relação à Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera*.** 2000. 59f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- SANTOS, S. C.; COSTA, W. F. RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.
- SANTOS, S. A. B.; ROSELINO, A. C.; BEGO, L. R. Ecology, behavior and bionomics pollination of cucumber, *Cucumis sativus* L. (Cucurbitales, Cucurbitaceae), by the stingless bees *Scaptotrigona aff. depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in Greenhouses. **Neotropical Entomology**, v. 37, n 5, p. 506-512, 2008.
- SAS System for Windows. Version 9.1. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA, 2003.
- SCALON, V.R. **Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae – Mimosoideae).** 2007. 264f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- SHIMANUKI, H.; LEHNERT, T.; STRCKER, M. Differential collection of cranberry pollen by honeybees. **Journal Econ. Entomol.**, v. 60, p. 1031-1033, 1967.
- SILVA, I. C. **Avaliação de dietas para criação de operárias e zangões de *Apis mellifera* L. (africanizadas) (Hymenoptera:Apidae) em condições de laboratório.** 1995. 85f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

- SILVA, I.C.; MESSAGE, D.; CRUZ, C. D.; SILVA., M. V. G. B. Aplicação de análises multivariadas para determinação da casta de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), obtidas em laboratório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 635-640, 2005.
- SILVA, I. C. MESSAGE, D.; CRUZ, C. D.; CAMPOS, L. A O.; SOUJA-MAJER, M. J. Rearing africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) brood under laboratory conditions. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 2, p. 623-629, 2009.
- SILVEIRA, M. A. L. **Avaliação dos efeitos da toxina Cry 1Ac do *Bacillus thuringiensis* em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas.** 2008. 92f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- SLAA, E.J.; SANCHES, L. A.; SANDI, M.; SALAZAR, W. A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. **Apidologie**, v. 31, p. 141-142, 2006.
- SMIRLE, M.J. The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honey bees. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 420-424, 1993.
- SOUZA, T.F.; CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O.C.; FERNANDES, J.B.; ALMEIDA, S.S.M.S. Toxic effects of methanolic and dichloromethane extracts of flowers and peduncles of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae: Mimosoideae) on *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* workers. **J. Apicultural Research**, v.45, n.3, p.112-116, 2006.
- STOCKSTAD, E. The case of empty hives. **Science**, v. 316, p. 970-972, 2007.
- TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; DRIEMEIER, D.; COSTA, J. B. D.; CAMARGO, A. J. R. Aborto em vacas na intoxicação experimental por *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 35-38, 1998.
- TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320p.
- VanENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E. *et al.* Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, e6481, 2009. Disponível em: <http://www.plosone.org/doi:10.1371/journal.pone.0006481>. Acesso em: 24 Oct. 2010.
- VAN DER STEEN, J. J. M. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. **Apidologie**, v. 32, p. 399-406, 2001.
- XAVIER, V. M. **Impacto de inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera : Apidae).** 2009. 34f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. **Science**, v. 265, p. 1170, 1994.