

RODRIGO LOPES AMARAL

**EFEITO DE FORMULAÇÕES DE NIM NA SOBREVIVÊNCIA DE
OPERÁRIAS DE *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA,
MINAS GERAIS – BRASIL**

2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A485e
2011

Amaral, Rodrigo Lopes, 1985-
Efeito de formulações de nim na sobrevivência de operárias
de *Apis mellifera* / Rodrigo Lopes Amaral. – Viçosa, MG,
2011.
vi, 21f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Madelaine Venzon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 18-21

1. Abelha. 2. *Apis mellifera*. 3. Inseticidas vegetais
4. Testes de toxicidade. 5. Polinização por inseto.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

RODRIGO LOPES AMARAL

**EFEITO DE FORMULAÇÕES DE NIM NA SOBREVIVÊNCIA DE
OPERÁRIAS DE *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2011.

Profa. Maria Augusta Lima Siqueira

(Coorientador)

**Prof. Raul Narciso Carvalho
Guedes**

(Coorientador)

Prof. Gustavo Ferreira Martins

Prof. Sebastião Martins Filho

Profa. Madelaine Venzon

(Orientador)

Aos meus pais, Ênio Amaral e Adriana Pereira Lopes Amaral

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/SDA) (Edital CNPq/MAPA/SDA Nº 064/2008)

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra Madelaine pela orientação e aprendizado. À Dra Maria Augusta, pelos ensinamentos e pela coorientação. Ao Dr. Raul pela ajuda sempre que necessária. Ao Dr. Sebastião pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Apiário pela ajuda nos experimentos, principalmente ao “Lulu”, Íris e “Cabrito”.

Ao Dr. Alexander Machado Auad pela orientação durante minha graduação e aos colegas de EMBRAPA pelo auxílio durante minha passagem pelo Laboratório de Entomologia.

Aos amigos de Tocantins, grandes amigos de longa data e sempre presentes pro que der e vier, Ricardo, Samuca, Stephane, Myller, Guilherme, Vinícius e muitos outros. Aos amigos de Juiz de Fora que me auxiliaram nessa caminhada Diogo, Felipe, Gustavo, Cacá, Cristiano, Victor, Carlos, Cassiano e os amigos da UFJF pela amizade durante a graduação.

Aos amigos da primeira república em que morei, Rafael, Índio, Thiago e Raísa pela companhia em todas as horas e os bons momentos que vivemos juntos. E aos amigos da minha segunda república, Guilhaerminho “Pokemon” e Caio, pelo apoio e amizade nas horas mais difíceis.

Aos amigos da Entomologia Vinícius, Eduardo, Felipe, Natália, Verônica, Juliana pelos ótimos momentos propiciados durante esses dois anos de convívio e ajuda durante esse período. Aos amigos do laboratório Pedro, André, Maíra, Dany, Álex, Elaine e Juliana pela ajuda e conselhos durante os períodos mais difíceis e pela companhia nos bons momentos.

Primordialmente agradeço aos meus pais, Ênio e Adriana, meus irmãos, Paula e André, meus avós Nenê e Wilson, Geny e João e a todos meus familiares pelo apoio incondicional nos melhores e piores momentos.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	3
Toxicidade de produtos à base de nim a forrageiras de <i>A. mellifera</i>	3
<i>Coleta e manutenção das abelhas</i>	3
<i>Formulações a base de nim utilizadas</i>	3
<i>Bioensaios com forrageiras</i>	4
<i>Análises estatísticas</i>	5
Avaliação da toxicidade de Azamax® a larvas de <i>A. mellifera</i>	5
<i>Coleta e criação de larvas de A. mellifera</i>	5
<i>Formulação a base de nim testada</i>	6
<i>Análises estatísticas</i>	8
RESULTADOS	8
Toxicidade de produtos à base de nim a forrageiras de <i>A. mellifera</i>	8
Toxicidade de Azamax® a larvas de <i>A. mellifera</i>	13
DISCUSSÃO	15
CONCLUSÕES GERAIS	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

RESUMO

AMARAL, Rodrigo Lopes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Efeito de formulações de nim na sobrevivência de operárias de *Apis mellifera*.** Orientador: Madelaine Venzon. Coorientadores: Maria Augusta Lima Siqueira e Raul Narciso Carvalho Guedes.

A polinização é uma atividade ameaçada pelo uso indiscriminado de pesticidas, os quais podem ter efeitos letais sobre as abelhas, principalmente as operárias forrageiras, devido ao seu maior contato com os pesticidas, mas também sobre as larvas, caso o pesticida seja transportado para dentro da colmeia. Pesticidas botânicos supostamente apresentam vantagem sobre os sintéticos e podem ser usados como alternativa viável no controle de pragas acarretando menos prejuízos à entomofauna benéfica. O nim, *Azadirachta indica*, se destaca dentre estes pesticidas botânicos por sua eficiência no controle de pragas. Neste trabalho foi avaliado o efeito do nim na sobrevivência de operárias forrageiras e de larvas de *Apis mellifera*. Foram testados três inseticidas à base de nim, Organic Neem (1,7 g i.a./L), Azamax[®] (12 g i.a./L) e Neemseto (2,4 g i.a./L), misturados à dieta de operárias forrageiras. Abelhas tratadas com Organic Neem não apresentaram diferenças significativas na sua sobrevivência assim como aquelas tratadas com as menores concentrações de Azamax[®]. Abelhas que receberam a maior concentração de Azamax[®] (480 mg i.a./L) e Neemseto (96 mg i.a./L) tiveram sua sobrevivência reduzida. No caso de Neemseto essa menor sobrevivência pode ser explicada pela presença de outros compostos além da azadiractina, como salanina e nimbina. Já para Azamax[®] pode ser devido ao alto teor de azadiractina contido na formulação. Em larvas foi testado apenas o Azamax[®] nas concentrações de 60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L misturadas à dieta artificial oferecida. A mortalidade das larvas tratadas foi de 100% e nenhuma larva conseguiu atingir o estágio de pupa. Foi observado baixo consumo de alimento evidenciando ação fagoinibidora do nim. Azadiractina em baixas concentrações não se mostrou prejudicial a adultos de *A. mellifera*, porém mostrou ser altamente tóxica às larvas. Altas concentrações de azadiractina e a presença de outros componentes, como salanina e nimbina, na formulação dos inseticidas podem ter sido a causa da alta toxicidade a abelhas adultas.

ABSTRACT

AMARAL, Rodrigo Lopes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Effect of neem formulations on the survival of *Apis mellifera* workers.** Adviser: Madelaine Venzon. Co-advisers: Maria Augusta Lima Siqueira and Raul Narciso Carvalho Guedes.

Pollination is an activity threatened by the indiscriminate use of pesticides, which can lead to lethal effects on bees, especially in forager adults due to their contact with pesticides, but also on larvae if the pesticides are carried back to the nest. Botanical pesticides supposedly have advantage over synthetics, and can be used as a viable alternative to control pests causing minor damage to beneficial insects. The neem tree, *Azadirachta indica*, stands out among these botanical pesticides, because of its efficiency in pest control. On this basis, we evaluated the effect of neem on the survival of forager adults and of larvae of *Apis mellifera*. We tested three neem based insecticides, Organic Neem (1,7 g a.i./L), Azamax[®] (12 g a.i./L) and Neemseto (2,4 g a.i./L) mixed to the adult diets. Organic Neem-treated bees showed no significant differences in their survival as well as those treated with lower concentrations of Azamax[®]. Bees that received the highest concentration of Azamax[®] (480 mg a.i./L) and of Neemseto (96 mg a.i./L) had their survival reduced. In the case of Neemseto this lower survival can be explained by the presence of other compounds besides azadirachtin. For Azamax[®] can be due to the high content of azadirachtin contained in the formulation. Two concentrations of Azamax[®], 60 mg a.i./L e 120 mg a.i./L were tested in larvae, mixed to their diets. The mortality of treated larvae was 100% and none achieved the pupa stage. We observed low intake of food showing antifeedant action of neem. Azadirachtin at low concentrations was not harmful to adults of *A. mellifera*, but proved to be highly toxic to the larvae. High concentrations of azadirachtin and the presence of other components, such as nimbin and salanin, in the formulation of the insecticides may have seen the cause of the high toxicity to adult bees.

INTRODUÇÃO

A transferência do pólen da antera de uma flor para o estigma de outra ou da mesma flor, processo conhecido como polinização, é crucial na manutenção de quase todos os ecossistemas terrestres (Kevan, 1999), inclusive os agroecossistemas. A polinização é o primeiro passo para a formação de sementes. A deficiência nesse processo ocorre devido à chegada de uma pequena quantidade de pólen ao estigma, ao excesso de deposição dos gametas masculinos no órgão reprodutor feminino das flores, ao atraso nessa transferência ou à chegada ao estigma de grãos de pólen inviáveis ou de outras espécies (Wilcock & Neiland, 2002).

A maioria das plantas cultivadas depende dos polinizadores para a produção de frutos e sementes, sendo os insetos os principais vetores de pólen (Klein *et al.*, 2007). Os animais, particularmente as abelhas, polinizam mais de 66% das cerca de 1500 culturas plantadas no mundo (Roubik, 1995 *apud* Kremen, 2002).

A abelha melífera *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 é o polinizador de maior valor econômico em monoculturas no mundo todo (McGregor, 1976) e as perdas de algumas culturas podem chegar a até 90% sem esses polinizadores (Southwick & Southwick, 1992 *apud* Klein, 2007). A produção e qualidade de pomares e plantas comercializáveis podem ser incrementadas na presença de *A. mellifera* (Elzen *et al.*, 2004). Por esses motivos, e também por ter grande importância econômica devido à produção de mel, própolis e geleia real, é a espécie de polinizador mais estudada.

O envenenamento de abelhas por pesticidas é um problema comum ocorrido em lavouras, geralmente ocasionado por produtos de amplo espectro (Naumann, 1996). As operárias forrageiras, devido ao maior contato com pesticidas, são geralmente as mais afetadas por esses produtos, que podem ocasionar a sua morte (Naumann, 1996). Porém, os pesticidas também podem afetar as larvas, caso sejam transportados para dentro da colmeia, principalmente por meio de pólen e néctar contaminados (Naumann, 1996). Esse problema ocorre mais comumente com formulações que se aderem às corbículas das forrageiras (Johansen, 1981), estrutura responsável pelo transporte do pólen para as colônias.

O efeito dos pesticidas sobre a fauna de polinizadores dos agroecossistemas tem sido bem evidenciado, sendo diretamente responsável pela redução das populações de abelhas e indiretamente pelas perdas econômicas decorrentes do declínio das

populações desses polinizadores (Allen-Wardell et al., 1998; Kevan, 1999). Além disso, muitos pesticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as abelhas (Thompson, 2003), pois podem ocasionar efeitos subletais nas operárias, afetando assim sua capacidade forrageadora (Pham-Delègue et al., 2002; Rortais et al., 2005).

O controle de pragas agrícolas é geralmente feito com pesticidas sintéticos, mas o uso de pesticidas naturais tem surgido como importante alternativa devido, supostamente, a uma menor contaminação ao meio ambiente e a organismos não-alvo. Nesse contexto, pesticidas botânicos são promissores, pois possuem algumas vantagens em relação aos sintéticos utilizados, como por exemplo, rápida degradação, baixa a moderada toxicidade a humanos, ação rápida e relativa seletividade a organismos benéficos (Isman, 2006). No entanto, a rápida degradação também pode ser desvantajosa, uma vez que uma menor persistência no ambiente pode levar a um controle ineficiente (Wiesbrook, 2004). Além disso, fatores como ausência de dados relativos à toxicidade ao ambiente em geral, custo elevado para se alcançar o controle e toxicidade variável dependendo da espécie-alvo, podem tornar o uso dos pesticidas botânicos ineficaz (Isman, 2006; 2008).

Dentre os diversos inseticidas botânicos conhecidos, destaca-se o nim, *Azadirachta indica* A. Juss, planta originária do subcontinente indiano, por ser a mais estudada atualmente. O nim é conhecido por produzir compostos secundários com ação pesticida, sendo utilizado mundialmente na formulação de inseticidas naturais (Isman, 2006). Seu principal componente, a azadiractina, é um potente inibidor do crescimento de insetos (Ascher, 1993). Além disso, também possui ação nos sistemas digestivo, endócrino e reprodutivo dos insetos, dentre os quais se destacam a atividade fagoinibitória em vários insetos, a inibição do desenvolvimento de imaturos, além de reduzir também a fertilidade e fecundidade dos adultos (Lynn et al, 2010).

Os trabalhos que avaliaram efeitos do nim em abelhas foram realizados principalmente com *A. mellifera*. Nessa espécie, alguns estudos demonstraram que produtos a base de *A. indica* não interferiram sobre a mortalidade de operárias adultas (Melathopoulos et al., 2000a); taxas de remoção e substituição da cria (Thompson et al., 2005); produção de espermatozóides em zangões (Thompson et al., 2005); acasalamento e postura de rainhas (Thompson et al., 2005); e comportamento de forrageamento das abelhas campeiras (Elzen et al., 2004).

Para o uso adequado dos produtos à base de nim deve-se conhecer os efeitos sobre os principais organismos benéficos associados aos agroecossistemas pulverizados com o pesticida. Além disso, esses produtos necessitam conter informações técnicas essenciais, como as concentrações necessárias para um controle satisfatório. No mercado brasileiro estão disponíveis diversas formulações à base de nim. Dentre estas, poucas contêm informações sobre o teor de azadiractina presente e apenas uma é registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Visando fornecer informações sobre a toxicidade desses produtos sobre *A. mellifera*, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a toxicidade de três formulações a base de nim encontradas no mercado brasileiro e com concentração de azadiractina conhecida. Para isso foram realizados experimentos com adultos e com larvas de *A. mellifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxicidade de produtos à base de nim a forrageiras de *A. mellifera*

Coleta e manutenção das abelhas

Forrageiras de *A. mellifera* foram coletadas de colmeias mantidas no Apiário da UFV, quando retornavam do campo, utilizando-se um tubo de plástico de 20 mm de diâmetro conectado a uma gaiola de estrutura madeira (9 x 9 x 3 cm), coberta com tela plástica e forrada com papel filtro. A entrada das colméias foi fechada de modo que apenas operárias campeiras fossem coletadas. Desse modo as forrageiras coletadas ficaram presas nas gaiolas, sendo que em cada gaiola havia cerca de 10 abelhas. Um tubo de Eppendorf de 2mL com um orifício na base foi utilizado para servir de alimentador às abelhas. A dieta base foi formada por xarope composto por sacarose e água (1:1). As gaiolas com as abelhas foram mantidas em estufa do tipo B.O.D., sob condições controladas (temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e escotofase de 24 horas).

Formulações a base de nim utilizadas

Nos bioensaios com abelhas forrageiras foram testadas três formulações comerciais de produtos a base de nim disponíveis no mercado brasileiro e com concentração de azadiractina conhecida: Organic Neem (1,7 g azadiractina /L), obtido

da Dalquim Indústria e Comércio, Itajaí (SC); Azamax[®] (12 g azadirachtina /L), único com registro no MAPA, obtido do Grupo DVA, Campinas (SP); e Neemseto (2,4 g azadirachtina /L), obtido da Cruangi Neem do Brasil Ltda, Timbaúba (PE). As concentrações utilizadas foram determinadas com base em testes toxicológicos para pragas-alvo, utilizando-se doses letais e sub-letais ao ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae) e ao ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus* Banks, 1904 (Acari: Tarsonemidae) (Venzon *et al.*, 2010; Brito, 2010). Como espalhante para os produtos a base de nim, foi adicionado à dieta álcool etílico absoluto (EtOH) nas mesmas proporções nos tratamentos controle. O espalhante foi adicionado uma vez que os inseticidas não se misturavam à dieta.

Bioensaios com forrageiras

Previamente à realização dos experimentos foi testada a dieta artificial pura comparada à dieta artificial acrescida de etanol, afim de verificar a eficácia do produto como espalhante do inseticida na dieta. Não foram verificadas diferenças na mortalidade das abelhas entre as dietas e, portanto, o etanol foi utilizado nos experimentos, afim de se garantir a mistura do inseticida na dieta. Cada produto foi testado em um experimento separadamente, conforme descrito a seguir.

Experimento 1 - Para o Organic Neem foram feitos quatro tratamentos: a) Organic Neem na concentração de 51 mg i.a./L + dieta base (99,5%) + EtOH (0,5%); b) dieta base (99,5%) + EtOH (0,5%); c) Organic Neem na concentração de 102 mg i.a./L + EtOH (1%); d) dieta base (99%) + EtOH (1%).

Experimento 2 - Para o Azamax[®] foram feitos seis tratamentos: a) Azamax[®], na concentração de 60 mg i.a./L + dieta base (99,38%) + EtOH (0,062%); b) dieta base (99,38%) + EtOH (0,062%); c) Azamax[®], na concentração de 120 mg i.a./L + dieta base (99,88%) + EtOH (0,12%); d) dieta base (99,88%) + EtOH (0,12%); e) Azamax[®], na concentração de 480 mg i.a./L + dieta base (99,5%) + EtOH (0,5%); f) dieta base (99,5%) + EtOH (0,5%).

Experimento 3 - Para o Neemseto foram feitos seis tratamentos: a) Neemseto, 12 mg i.a./L + dieta base (99,38%) + EtOH (0,062%); b) dieta base (99,38%) + EtOH (0,062%); c) Neemseto, 48 mg i.a./L + dieta base (99,88%) + EtOH (0,25%); d) dieta

base (99,88%) + EtOH (0,12%); e) Neemseto 96 mg i.a./L + EtOH (0,5%); f) dieta base (99,5%) + EtOH (0,5%).

Para cada experimento foram feitas cinco repetições (cinco gaiolas) para cada tratamento, sendo cada repetição representada por cerca de 10 abelhas coletadas na mesma colmeia, totalizando cerca de 50 abelhas avaliadas em cada tratamento. Para cada repetição foram utilizadas abelhas de cinco colmeias diferentes. Como essas abelhas são insetos eussociais avançados, operárias da mesma colmeia são geneticamente muito semelhantes entre si. Neste caso, a variabilidade genética populacional ocorre entre indivíduos de diferentes colônias, o que justifica a utilização de diferentes ninhos para a obtenção das abelhas, a fim de se evitar pseudo-repetições. As dietas foram mantidas nas gaiolas durante os três primeiros dias de experimento, a fim de se simular uma situação de campo. Após esse período foi trocada diariamente.

A mortalidade das abelhas foi avaliada diariamente e o experimento teve duração de 10 dias (período em que todos os indivíduos morreram), 12 dias e 16 dias para Organic Neem, Neemseto e Azamax[®], respectivamente.

Análises estatísticas

As curvas de sobrevivência das abelhas forrageiras nos três experimentos foram geradas pelo estimador de Kaplan-Meier e posteriormente comparadas pelo teste *Logrank* a 5%.

Avaliação da toxicidade de Azamax[®] a larvas de *A. mellifera*

*Coleta e criação de larvas de *A. mellifera**

A avaliação de toxicidade do Azamax[®] em larvas de *A. mellifera* foi conduzida no Apiário da UFV. Todo material utilizado para montagem dos experimentos, coleta das larvas, preparo e acondicionamento da dieta, foi autoclavado ou esterilizado com luz ultravioleta germicida em capela de exaustão de gases. As larvas de abelhas foram obtidas em cinco colmeias de *A. mellifera* coletadas no município de Viçosa, MG, Brasil (20°45'S e 42°52'W) e posteriormente transferidas para o Apiário da Universidade Federal de Viçosa.

Favos de cria contendo larvas de operárias foram obtidos das colmeias e transferidos para o laboratório. A metodologia utilizada para a criação das larvas foi proposta por Rembold & Lackner (1981) e modificada por Silva et al. (2005). Larvas de 1º instar (com idade máxima de 24h) foram coletadas dos favos de cria com o auxílio de um estilete de metal com extremidade dobrada em ângulo reto.

Para a criação das larvas foram utilizadas cúpulas de polietileno (9,8mm de altura x 5,6 mm de largura inferior x 8,8 mm de largura superior), previamente montadas em placas de Petri, utilizando como base um disco de E.V.A. perfurado. Em cada placa foram colocadas 40 cúpulas, identificadas individualmente. As cúpulas foram preenchidas, com o auxílio de uma micropipeta de repetição, com 4µl de dieta artificial conforme sugerido por Rembold & Lackner (1981) modificado por Silva *et al.* (2005). Posteriormente, as larvas foram transferidas para as cúpulas com o auxílio do estilete, onde foram colocadas sobre a dieta.

A dieta artificial foi constituída por 49,0% de geleia real, 36,3% de água, 6,8% de d-frutose, 6,8% de d-glicose e 1,1% de extrato de lêvedo de cerveja (Vandenberg & Shimanuki, 1987 modificada por Silva et al., 2005). Os açúcares e o extrato de lêvedo foram dissolvidos na água e filtrados em membrana Millipore de 0,22µm. Essa solução foi em seguida misturada à geleia real. A dieta foi então homogeneizada e armazenada em congelador abaixo de 0 °C em frascos de vidro estéreis, por no máximo 10 dias após preparo.

Após a transferência, as larvas foram observadas com o auxílio de um estereomicroscópio, para verificar se todos os indivíduos utilizados nos bioensaios estavam vivos durante o início do experimento. As larvas que não apresentaram movimento dos espiráculos foram descartadas e suas cúpulas foram substituídas por outras contendo indivíduos vivos.

Formulação a base de nim testada

O produto Azamax[®] foi escolhido para ser utilizado nos ensaios com larvas, pois é o único que possui registro no MAPA. As concentrações testadas (60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L) foram determinadas com base nos resultados dos experimentos com *T. urticae*, pois foram as concentrações responsáveis por paralisar seu crescimento (60 mg

i.a./L e sua CL_{95} (120 mg i.a./L) (Venzon, 2010; Brito, 2010). As larvas foram alimentadas por cinco dias consecutivos, contados a partir do dia da transferência, com 4, 15, 25, 50 e 70 μ l de dieta em todos os tratamentos. A quantidade de alimento diária foi determinada como sendo a melhor proporção de dieta para ser fornecida às larvas no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia, respectivamente (Silva et al., 2005).

Os tratamentos consistiram de dieta pura para o controle e dieta contendo o produto, nas concentrações de 60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L de Azamax[®].

Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri contendo 40 larvas, provenientes das caixas de criação do Apiário da UFV (Fig. 1). As placas foram colocadas em frascos dessecadores mantidos em estufa do tipo B.O.D. a $34 \pm 1^\circ\text{C}$, 99% de umidade relativa, alcançada com a utilização de algodão embebido em água destilada, mantidos no interior dos dessecadores e trocados diariamente, e em escotofase durante 24 horas até o término do período de alimentação. Após o término da ingestão da dieta, as placas foram retiradas dos frascos e mantidas na mesma estufa a $34 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade e escotofase de 24 horas até a emergência dos adultos. Foram feitas observações diárias para avaliar a mortalidade e a duração dos estágios de larva e de pupa.

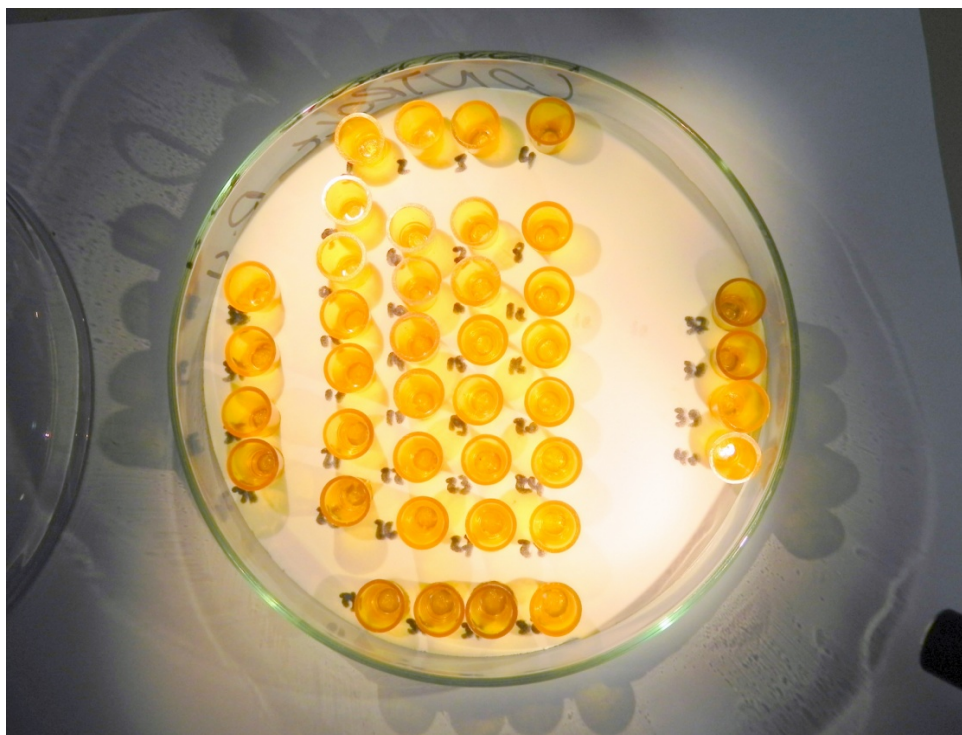


Figura 1. Placa de Petri contendo células com larvas utilizadas nos experimentos para testes de toxicidade letal de Azamax em imaturos de *Apis mellifera*.

Análises estatísticas

As curvas de sobrevivência das abelhas forrageiras nos três tratamentos foram geradas pelo estimador de Kaplan-Meier e posteriormente comparadas pelo teste *Logrank* a 5%.

RESULTADOS

Toxicidade de produtos à base de nim a forrageiras de *A. mellifera*

Forrageiras de *A. mellifera* alimentadas com dieta acrescida de Organic Neem nas concentrações de 51 mg i.a./L e 102 mg i.a./L não apresentaram diferenças na sobrevivência em relação a operárias tratadas com a dieta misturada apenas ao etanol (*Logrank*, $\chi^2 = 2,4$; g.l.= 3; $p = 0,49$) (Fig. 2).

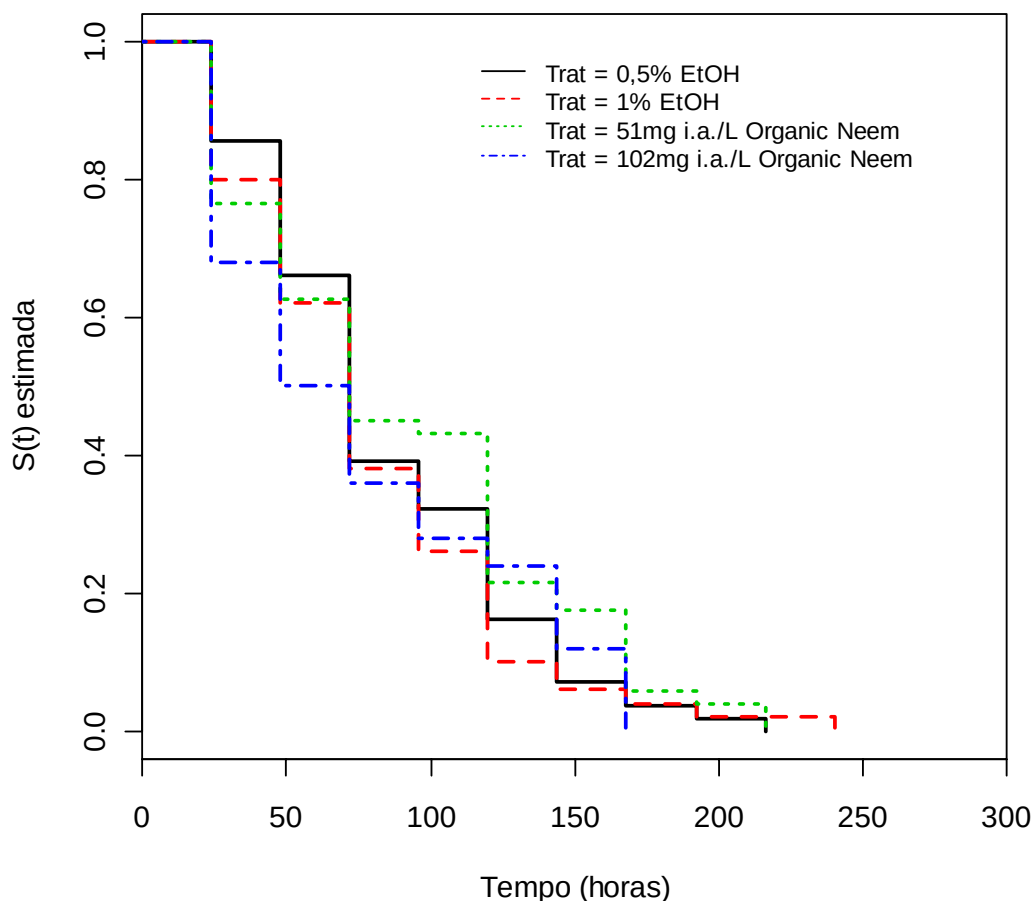


Figura 2- Sobrevivência ($S(t)$) estimada por Kaplan-Meier de forrageiras de *A. mellifera* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações (51 mg i.a./L e 102 mg i.a./L) de Organic Neem, misturado a Etanol Absoluto (EtOH), usado como espalhante ($\text{Logrank}, \chi^2 = 2,4$; g.l.= 3; $p = 0,492$).

No experimento no qual as abelhas foram submetidas à ingestão de dieta com Azamax[®], houve diferenças significativas na sobrevivência entre os diferentes tratamentos ($\text{Logrank}, \chi^2 = 34,4$; g.l.= 5; $p < 0,0001$) (Fig. 3).

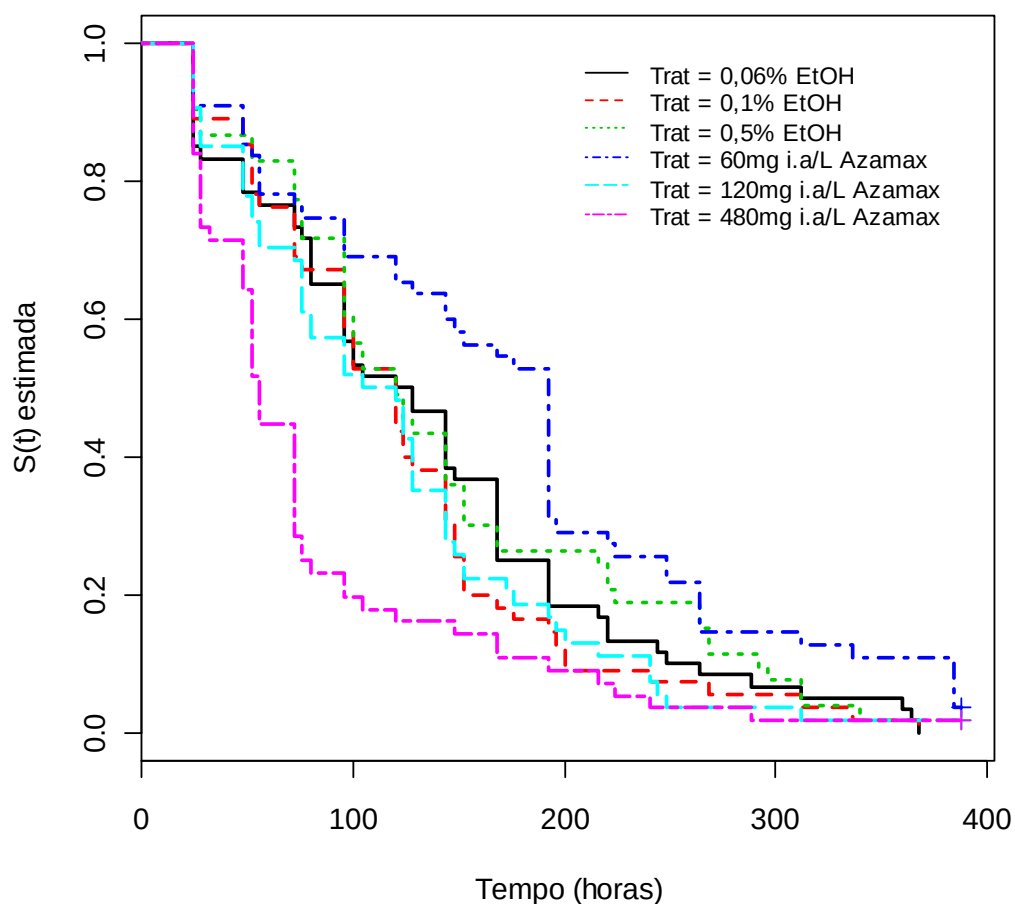


Figura 3. Sobrevivência ($S(t)$) estimada por Kaplan-Meier de forrageiras de *A. mellifera* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações (60 mg i.a./L, 120 mg i.a./L e 480 mg i.a./L) de Azamax[®], misturado a Etanol Absoluto (EtOH), usado como espalhante (*Logrank*, $\chi^2=34,4$; g.l.= 5; $p<0,0001$).

Abelhas que receberam a maior concentração de Azamax[®] (480mg i.a./L) sobreviveram significativamente menos em comparação com as abelhas que receberam os demais tratamentos (Tab. 1, Fig.3). Não houve diferenças significativas na sobrevivência entre as abelhas tratadas com a concentração intermediária do produto, 120mg i.a./L (Tab. 1). As abelhas que receberam a menor concentração (60mg i.a./L) do produto tiveram um aumento significativo na sua sobrevivência em relação às demais abelhas utilizadas no bioensaio, com exceção àquelas que receberam apenas 0,5% EtOH misturado à sua dieta (Tab. 1, Fig. 3).

Tabela 1 – Teste *Logrank* para comparação de curvas de sobrevivência de operárias de *A. mellifera* tratadas com dietas com e sem adição Azamax[®].

Comparação	Valor p	χ^2
0,06% EtOH x 0,1% EtOH	0,373	0,8
0,06% EtOH x 0,5% EtOH	0,66	0,2
0,06% EtOH x 60mg i.a/L Azamax [®]	0,00614	7,5
0,06% EtOH x 120mg i.a/L Azamax [®]	0,335	0,9
0,06% EtOH x 480mg i.a/L Azamax [®]	0,00163	9,9
0,1% EtOH x 0,5% EtOH	0,224	1,5
0,1% EtOH x 60mg i.a/L Azamax [®]	0,000702	11,5
0,1% EtOH x 120mg i.a/L Azamax [®]	0,939	0
0,1% EtOH x 480mg i.a/L Azamax [®]	0,00913	6,8
0,5% EtOH x 60mg i.a/L Azamax [®]	0,0808	3
0,5% EtOH x 120mg i.a/L Azamax [®]	0,147	2,1
0,5% EtOH x 480mg i.a/L Azamax [®]	0,000168	14,2
60mg i.a/L Azamax [®] x 120mg i.a/L Azamax [®]	0,00116	10,6
60mg i.a/L Azamax [®] x 480mg i.a/L Azamax [®]	< 0,0001	23,6
120mg i.a/L Azamax [®] x 480mg i.a/L Azamax [®]	0,0129	6,2

Valores em negrito indicam significância a 5% de probabilidade nas comparações das concentrações.

No bioensaio testando-se o produto Neemseto houve diferenças significativas na sobrevivência das abelhas alimentadas com as dietas com e sem o produto (*Logrank*, $\chi^2=138$; g.l= 5; $p<0,0001$) (Fig. 4).

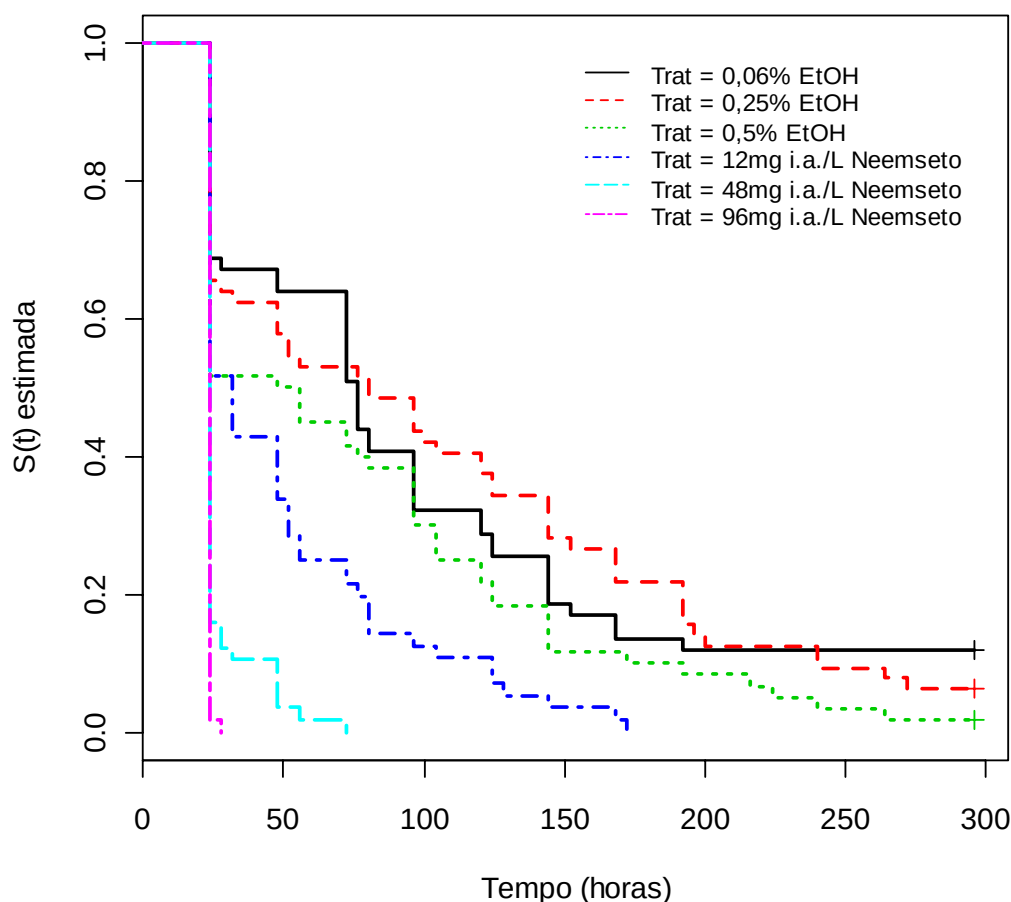


Figura 4. Sobrevivência ($S(t)$) estimada por Kaplan-Meier de forrageiras de *A. mellifera* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações (12 mg i.a./L, 48 mg i.a./L e 96 mg i.a./L) de Neemseto, misturado a Etanol Absoluto (EtOH), usado como espalhante (*Logrank*, $\chi^2=138$; g.l= 5; $p<0,0001$).

As abelhas tratadas com quaisquer concentrações de Neemseto, da mais baixa à mais alta tiveram sobrevivência significativamente menor em comparação àquelas dos tratamentos controle (Tab. 2). Com o aumento da concentração de Neemseto utilizada, houve uma maior mortalidade das abelhas. (Tab. 2, Fig. 4).

Tabela 2 – Teste *Logrank* para comparação de curvas de sobrevivência de operárias de *A. mellifera* tratadas com dietas com e sem adição Neemseto.

Comparação	Valor p	χ^2
0,06% EtOH x 0,25% EtOH	0,868	0
0,06% EtOH x 0,5% EtOH	0,112	2,5
0,06% EtOH x 12mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	15,7
0,06% EtOH x 48mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	60,7
0,06% EtOH x 96mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	63,6
0,25% EtOH x 0,5% EtOH	0,0489	3,9
0,25% EtOH x 12mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	19,9
0,25% EtOH x 48mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	54,1
0,25% EtOH x 96mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	59,8
0,5% EtOH x 12mg i.a/L Neemseto	0,00618	7,5
0,5% EtOH x 48mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	38,9
0,5% EtOH x 96mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	42,3
12mg i.a/L Neemseto x 48mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	24,1
12mg i.a/L Neemseto x 96mg i.a/L Neemseto	< 0,0001	42
48mg i.a/L Neemseto x 96mg i.a/L Neemseto	0,00254	9,1

Valores em negrito indicam significância a 5% de probabilidade nas comparações das concentrações.

Toxicidade de Azamax[®] a larvas de *A. mellifera*

Houve diferenças significativas na sobrevivência de larvas alimentadas com dietas com e sem Azamax[®] (*Logrank*, $\chi^2=250$; g.l= 2; $p<0,0001$) (Fig. 5). Larvas de *A. mellifera* do tratamento controle sobreviveram por um período significativamente maior em comparação àquelas tratadas com Azamax[®] 60 mg i.a./L (*Logrank*, $\chi^2=168$; g.l= 1; $p<0,0001$) e 120 mg i.a./L (*Logrank*, $\chi^2=178$; g.l= 1; $p<0,0001$). Também houve diferença significativa entre as larvas tratadas com as concentrações de 60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L, de Azamax[®] (*Logrank*, $\chi^2=4,5$; g.l= 1; $p=0,0337$).

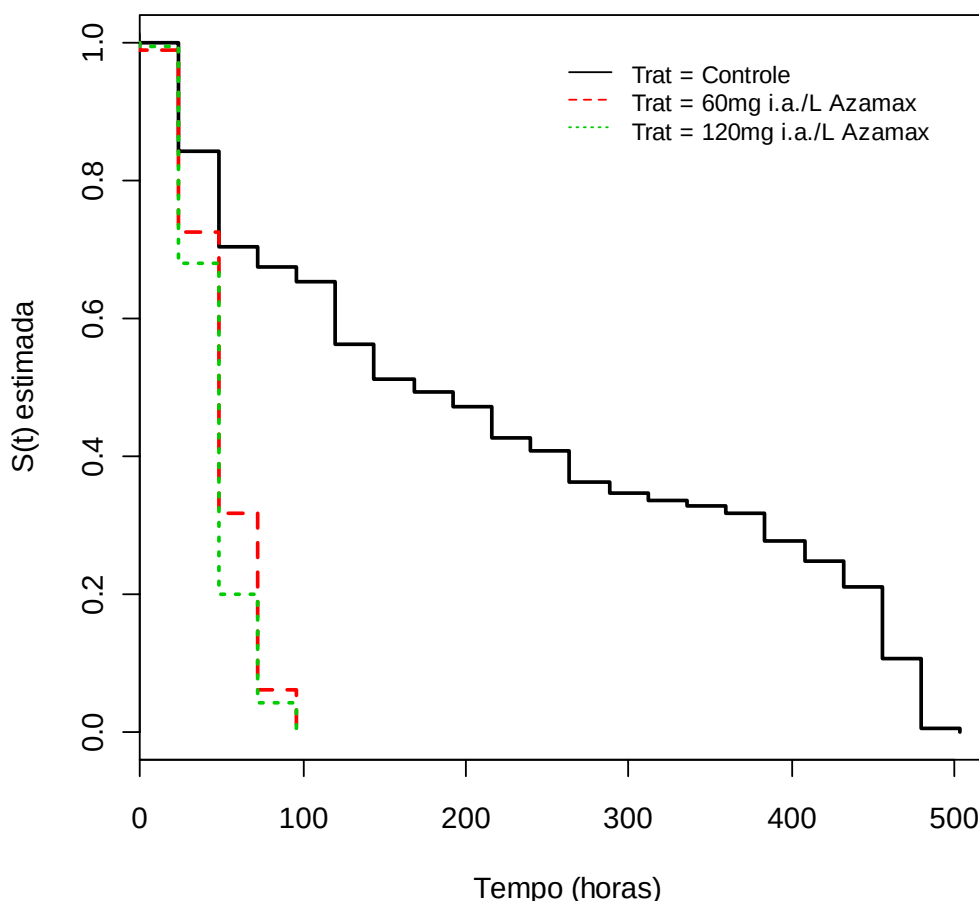


Figura 5. Sobrevivência ($S(t)$) estimada por Kaplan-Meier de larvas de *A. mellifera* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações (60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L aza) de Azamax[®], (*Logrank*, $\chi^2=250$; g.l= 2; $p<0,0001$).

Nenhuma das larvas tratadas com o produto conseguiu atingir o estágio pupal. As larvas tratadas com Azamax[®] apresentaram uma inibição da alimentação, uma vez que as cúpulas de criação de abelhas permaneceram com o alimento do seu interior praticamente intacto, diferente do ocorrido com as larvas criadas apenas com dieta artificial. Larvas tratadas com o produto nas duas concentrações (60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L) não ultrapassaram o quarto dia de vida. Sessenta larvas (30%) do tratamento

controle conseguiram atingir a fase adulta, e sobreviveram por até vinte dias após o início dos experimentos.

DISCUSSÃO

A sobrevivência de forrageiras de *A. mellifera* não foi afetada pela ingestão de dietas contendo diferentes concentrações do produto Organic Neem e nas menores concentrações do produto Azamax[®]. Entretanto, a ingestão de dieta contendo o produto Neemseto acelerou a mortalidade das abelhas campeiras. Para as abelhas que ingeriram dieta contendo 51 mg i.a./L e 102 mg i.a./L de Organic Neem, 50% sobreviveram 70 e 48 horas, respectivamente. Para as que ingeriram dieta com 60 mg i.a./L, 120 mg i.a./L e 480 mg i.a./L de Azamax[®], 50% sobreviveram 176, 104 e 52 horas, respectivamente. Já para o Neemseto, a sobrevivência de 50% da população alimentada com as dietas 12 mg i.a./L, 48 mg i.a./L e 96 mg i.a./L de Neemseto foi de 24 horas.

As colméias tiveram sua entrada fechada, para que apenas operárias campeiras fossem coletadas, com isso as abelhas coletadas já estavam em idade avançada, o que pode ter precipitado sua morte nos experimentos (Page Jr & Peng, 2001).

A sobrevivência diferencial das abelhas alimentadas com as dietas contendo os diferentes produtos a base de nim provavelmente ocorreu devido às diferentes formulações e concentrações de ingrediente ativo. A diminuição no tempo de vida das abelhas tratadas com Neemseto pode ter sido causada pela presença de outros compostos na formulação além da azadiractina, como nimbina e salanina, compostos presentes na planta e que também têm ação inseticida, conforme informado pelo fabricante no rótulo. A maior mortalidade causada pela maior concentração de Azamax[®] possivelmente não deve ser verificada no campo, uma vez que essa dose é mais alta do que aquela utilizada na prática, nesse caso a mais alta concentração recomendada não ultrapassa 60 mg i.a./L de água. No entanto, esta concentração foi testada, pois foi a menor concentração responsável pela paralisação do crescimento populacional do ácaro branco *P. latus* (Venzon, 2010; Brito, 2010).

Embora não tenha sido quantificada, foi observada uma diminuição no consumo das dietas contendo Azamax[®] e Organic Neem. Entretanto, essa fagoinibição não foi suficiente para afetar a sobrevivência das abelhas tratadas com Organic Neem. No caso

da sobrevivência das abelhas tratadas com Azamax[®] na maior concentração (480 mg i.a./L), a maior mortalidade pode ter sido consequência tanto do efeito tóxico do produto, quanto da inibição da alimentação. Para as abelhas expostas ao Neemseto, não foi possível constatar uma inibição da alimentação devido à rápida mortalidade. Melathopoulos *et al.* (2000a) também observaram que abelhas tratadas com dieta misturada a um extrato de azadiractina diminuíram o consumo de alimento. Esse efeito de inibição da alimentação ocorre devido a alguns efeitos secundários da azadiractina que afetam os quimiorreceptores do sistema digestivo dos insetos (Aerts & Mordue, 1997). No presente trabalho, é possível que este processo tenha ocorrido nas abelhas tratadas com os produtos derivados do nim, resultando em fagoinibição, pois já foi comprovado que forrageiras de *A. mellifera* conseguem discriminar entre soluções de açúcar pura e acrescidas de extrato de semente de nim em condições de laboratório (Naumann *et al.*, 1994). Em condições de campo, esta capacidade pode ser utilizada como uma estratégia de defesa das forrageiras, uma vez que elas poderiam evitar plantas tratadas com nim.

As larvas de *A. mellifera* se mostraram suscetíveis às diferentes concentrações de Azamax[®] misturadas à dieta artificial. A azadiractina é um conhecido regulador de crescimento, o que deve ter causado a ausência de imaturos no estágio de pupa entre aqueles que receberam o produto em sua dieta. Esse resultado se assemelha com aqueles encontrados por Sharma *et al.* (1980), nos quais a principal causa de morte de larvas de insetos tratadas com azadiractina foi devido a problemas durante o processo de ecdise.

Nas cúpulas das larvas tratadas com Azamax[®] foram observadas grandes quantidades de alimento, em comparação com as cúpulas contendo dieta sem nim, sugerindo uma inibição da alimentação por parte do inseticida. Consequentemente, nenhuma das larvas tratadas conseguiu atingir a fase pupal, evidenciando assim uma rápida ação tóxica do produto às larvas, matando-as nos primeiros estágios larvais.

Foi verificada uma alta taxa de mortalidade no tratamento controle, o que já era esperado devido às condições artificiais do experimento. Vandenberg e Shimanuki (1987) obtiveram apenas 57% de sobrevivência larval em experimento sob condições semelhantes.

Caso estes resultados também ocorram em condições de campo, poderá haver uma drástica diminuição populacional nas colônias, pois imaturos são importantes para o desenvolvimento da colônia e reduções na cria podem ser mais prejudiciais à colônia

do que a perda de forrageiras. A substituição de forrageiras mortas é bem sucedida em colmeias de *A. mellifera*, caso haja cria e abelhas jovens suficientes (Thompson, 2003). Porém, colmeias que apresentam altas taxas de mortalidade larval tendem a perecer.

Entretanto, para que as larvas sejam contaminadas, é necessário que a azadiractina contamine o alimento larval, através do néctar ou pólen de plantas tratadas com o nim. Naumann *et al* (1994) relataram que operárias forrageiras não adquiriram quantidades detectáveis de azadiractina após forrageamento em flores pulverizadas, o que pode diminuir as chances de contaminação das larvas dentro da colmeia. É possível, no entanto, que as larvas sejam expostas à azadiractina quando produtos à base de nim são utilizados para o controle de parasitas e patógenos da colmeia (Melathopoulos *et al.*, 2000b) ou quando as colmeias estejam localizadas próximas a plantios pulverizados com nim.

Para se evitar a contaminação de colmeias localizadas em plantações pulverizadas, deve-se fechar a entrada das mesmas durante a aplicação do inseticida. Isto deve ocorrer em horários de menor taxa de forrageio, a fim de se evitar perdas na população de operárias, diminuindo assim as chances de déficits na polinização (Xavier, 2009).

Portanto, para que produtos à base de nim sejam utilizados de forma segura em áreas onde é exercida a apicultura, deve haver o manejo adequado das colmeias durante e após as pulverizações. Por repelir as forrageiras (Naumann *et al.*, 1994), provavelmente os extratos são seguros para operárias adultas com experiência no campo. Por outro lado, caso contamine a colmeia, pode levar a colônia ao colapso, devido à alta mortalidade observada em larvas tratadas até mesmo com baixas concentrações. Revisões periódicas da mortalidade da cria, após as pulverizações, podem indicar a ocorrência de contaminação. Neste caso, as colmeias devem ser transportadas para locais distantes dos plantios tratados.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os produtos à base de nim, Organic Neem e Azamax[®] em concentrações recomendadas pelo fabricante não apresentaram efeito tóxico sobre operárias forrageiras de *A. mellifera*, podendo ser alternativas viáveis no controle de pragas em plantios com presença desse polinizador;
- O Neemseto diminuiu a sobrevivência das forrageiras, apresentando efeito negativo em todas as concentrações testadas. Isso pode ser explicado pela sua formulação, uma vez que além de azadiractina como principal ingrediente ativo ele também possui salanina e nimbina, substâncias produzidas pela árvore do nim e que são tóxicas a insetos;
- O Azamax[®] na maior dose testada, devido à sua alta concentração de azadiractina, pode explicar a diminuição na sobrevivência das abelhas, através da sua toxicidade e da inibição da alimentação dos insetos;
- Larvas de *A. mellifera* se mostraram suscetíveis às concentrações de 60 mg i.a./L e 120 mg i.a./L. de Azamax[®] testadas, o que ressalta a importância de manejo de colmeias durante a aplicação deste inseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R. J.; MORDUE, A. J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. **Journal of Chemical Ecology**, v.23, n. 9, p. 2117-2132, 1997.

ALLEN-WARDELL, G. BERNHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANE, J.; COX, P. A.; DALTON, V.; FEISINGER, P.; INGRAM, M.; INOUE, D.; JONES, C. E.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOPOWETZ, H.; MEDELLIN, R.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G. P.; PAVLIK, B.; TEPEDINO, V.; TORCHIO, P.; WALKER, S. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, v.12, n. 1, p. 8-17, 1998.

ASCHER, K. R. S. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.22, n. 3-4, p. 433-449, 1993.

ELZEN, P. J.; ELZEN, G. W.; LESTER, G. E. Compatibility of an organically based insect control program with honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination in cantaloupes. **Journal of Economic Entomology**, v.97, n. 5, p. 1513-1516, 2004.

BRITO, E. F. **Potencialidade de formulações de nim contra o ácaro-branco *Polyphagotarsonemus latus* em pimenta malagueta e pinhão manso**. 2010. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, n.51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B. Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Management Science**, v.64, n. 1, 8-11, 2008.

JOHANSEN, C. A. Involvement of bee poisoning in integrated pest management with special reference to alfafa seed crops. In: PIMENTAL, D. (Ed.), **Handbook of Pest Management in Agriculture**. v.II. Boca Raton: Press Inc, p. 433-444, 1981.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.74, n. 1-3, p. 373-393, 1999.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKET, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **PNAS**, v.99, n. 26, p. 16812-16816, 2002.

LYNN, O. M.; SONG, W.; SHIM, J.; KIM, J.; LEE, K. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweetpotato whitefly and root-knot nematode. **Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.53, n. 6, p. 598-604, 2010.

MCGREGOR, S. E. Insect pollination of cultivated crop plants. USDA. [online] URL: <http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/> 1976.

MELATHOPOULOS, A. P.; WINSTON, M. L.; WHITTINGTON, R.; HIGO, H.; LE DOUX, M. Field evaluation of neem and Canola oil for the selective control of the honey bee (Hymenoptera : Apidae) mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari : Tarsonemidae). **Journal of Economic Entomology**, v.93, n. 3, p. 559-567, 2000a.

MELATHOPOULOS, A. P.; WINSTON, M. L.; WHITTINGTON, R.; SMITH, T.; LINDBERG, C.; MUKAI, A.; MOORE, M. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera : Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.2, p. 199-209, 2000b.

NAUMANN, K.; CURRIE, R. W.; ISMAN, M. B. Evaluation of the repellent effect of a neem insecticide on foraging honey bees and other pollinators. **The Canadian Entomologist**, v.126, n. 2, p. 225-230, 1994.

NAUMANN, K & ISMAN, M. B. Toxicity of a Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Insecticide to Larval Honey Bees. **American Bee Journal**, v.136, n. 7, p. 518-520, 1996.

PAGE Jr., R.E. & PENG, Y.S. Aging in development in social insects with emphasis on the honey bee. *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology** v.36, n. 4-6, 695-711, 2001.

PHAM-DELÈGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v.33, n. 5, p. 425-432, 2002.

REMBOLD, H.; LACKNER, B. Rearing of honeybee larvae in vitro: effect of yeast extract on queen differentiation. **Journal of Apicultural Research**, v.20, n. 3, p. 165-171, 1981.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v.36, n. 1, p. 71-83, 2005.

SHARMA, G.K., CZOPPELT, C., REMBOLD, H. Further evidence of growth disruption by neem seed fractions. **Journal of Applied Entomology**, v.90, n. 1-5, p.439-444, 1980.

SILVA, I. C.; MESSAGE, D.; DAMIÃO-CRUZ, C.; SILVA, M. V. G .B. Aplicação de análises multivariadas para determinação de casta de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), obtidas em laboratório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n. 2, p. 635-640, 2005.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v.12, n. 1-4, p. 1-4, p. 317-330, 2003.

THOMPSON, H.; WILKINS, S.; BATTERSBY, A. H.; WAITE, R. J.; WILKINSON, D. The effects of four insect growth-regulating (IGR) insecticides on honeybee (*Apis mellifera* L.) colony development, queen rearing and drone sperm production. **Ecotoxicology**, v.14, n. 7, p. 757-769, 2005.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Technique for rearing worker honey bees in the laboratory. **Journal of Apicultural Research**, v.26, n. 2, p.90-97, 1987.

VENZON, M.; OLIVEIRA, R. M.; PEREZ, A. L.; CRUZ, F. A. R.; OLIVEIRA, J. M.; PALLINI, A. Manejo de ácaros-praga em sistemas orgânicos de produção. in: VENZON, M.; PALLINI, A; PAULA JUNIOR, T. J. **Controle alternativo de pragas e doenças**, 2010.

WIESBROOK, M. L. Natural Indeed: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, v. 17, n.3, 2004.

WILCOCK, C.; NEILAND, R. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. **Trends in Plant Science**, v.7, n. 6, p. 270-277, 2002.

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