

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE**

CAMILA APARECIDA SILVA

**SEGURANÇA DE BIOINSETICIDA A BASE DE *BEAUVERIA BASSIANA* PARA A
ABELHA SEM FERRÃO *SCAPTOTRIGONA POSTICA* (HYMENOPTERA: APIDAE,
MELIPONINI)**

ARARAS

2023

CAMILA APARECIDA SILVA

**SEGURANÇA DE BIOINSETICIDA A BASE DE *BEAUVERIA BASSIANA* PARA A
ABELHA SEM FERRÃO *SCAPTOTRIGONA POSTICA* (HYMENOPTERA:
APIDAE, MELIPONINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Cornélio
Ferreira Nocelli

Coorientador: Prof. Dr. Renato Nallin
Montagnolli

ARARAS

2023

Silva, Camila Aparecida

Segurança de bioinseticida a base de Beauveria bassiana para a abelha sem ferrão Scaptotrigona postica (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) / Camila Aparecida Silva -- 2023.
47f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
Banca Examinadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, Ricardo Toshio Fujihara, Osmar Malaspina, Renato Nallin Montagnolli
Bibliografia

1. Meliponini . 2. Fungo entomopatogênico . 3. Avaliações de risco. I. Silva, Camila Aparecida. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



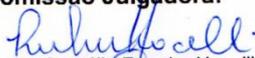
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

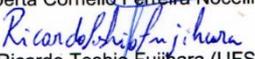
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

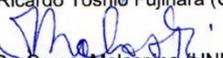
Folha de Aprovação

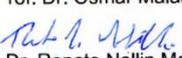
Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Aparecida Silva, realizada em 28/08/2023.

Comissão Julgadora:


Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)


Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara (UFSCar)


Prof. Dr. Osmar Malaspina (UNESP)


Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todo o Sagrado, por trazer todas as bênçãos para completar essa nova etapa de minha vida.

Aos meus pais, minha família, amigos, meu marido e irmãos de fé que sempre me apoiaram até em momentos em que o corpo não aguentava mais.

A minha orientadora, a Professora Roberta, que acreditou em mim e me trouxe tantos caminhos abertos, me treina para ser uma excelente pesquisadora e por ter me confiado uma vida de quatro patas, chamada Gaia.

Ao meu coorientador, o Prof. Renato, sempre disposto a contribuir e melhorar meus conhecimentos na microbiologia.

Aos meus colegas de laboratório do Grupo de Estudos e Pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais, por todo o vínculo criado, a disposição e prestatividade no percurso acadêmico.

A Dra. Gleiciani Bürger Patrício, por toda a ajuda, hospedagem, alimentação, a confiança como minha supervisora nas aventuras em campo.

A Mestre Ana Paula Salomé Lourencetti, a primeira a me acolher no grupo, me ouvindo e auxiliando em todos os processos da jornada acadêmica.

A Diretoria do CCA, por conceder minha bolsa de extensão ProEx nº 9861/2020-43 RTI “Difundindo e popularizando as atividades de ensino, pesquisa e extensão do CCA (Araras).”

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela aprovação e financiamento de todos os projetos de pesquisa relacionados aos estudos com abelhas nativas sem ferrão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Brasil abriga atualmente 259 espécies de abelhas sem ferrão, incluindo *Scaptotrigona postica*, conhecida como mandaguari-preta. Essa espécie desempenha um papel crucial na polinização de culturas agrícolas e outras plantas. No entanto, enfrenta ameaças devido à exposição a agrotóxicos. Buscando práticas agrícolas mais sustentáveis, o uso do fungo *Beauveria bassiana* para controle biológico tem ganhado destaque, embora sua segurança para as abelhas ainda não seja totalmente compreendida. Este estudo teve como foco avaliar a segurança do bioinseticida à base de *B. bassiana* em abelhas adultas de *S. postica*. O objetivo principal foi determinar a Dose Letal Média (DL₅₀) e a Concentração Letal Média (CL₅₀) do bioinseticida em diferentes concentrações, por exposição tópica e oral, sendo validado pelo controle positivo, o agrotóxico dimetoato, e verificar e comparar com os dados do fabricante a viabilidade e presença de conídios viáveis por meio de técnicas microbiológicas. Análises estatísticas empregaram um modelo binomial generalizado para construir curvas de dose-resposta e testes não paramétricos para avaliar a significância das concentrações perante o controle negativo. A toxicidade foi mais pronunciada na concentração de 20 µg/µL, sendo 100 vezes maior que a de campo, tanto por contato quanto por ingestão, evidenciando uma correlação entre concentração e probabilidade de mortalidade. A DL₅₀ estimada para *B. bassiana* em relação a *S. postica* foi de 2,3900 µg i.a/abelha, 11,95 vezes maior que a dose de campo. Similarmente, a CL₅₀ foi de 2,9736 µg/µL, 14,87 vezes maior que a concentração de campo de 0,2 µg/µL. O bioinseticida formulado com *B. bassiana* demonstrou alta viabilidade em meio nutritivo, garantindo sua qualidade. Os resultados sugerem que, embora concentrações mais altas do produto comercial à base de *B. bassiana* apresentem maior toxicidade, é possível definir níveis seguros para os organismos não-alvo. Isso é fundamental para promover a sustentabilidade agrícola e a preservação das abelhas, essenciais para ecossistemas saudáveis e segurança alimentar.

Palavras-chave: Meliponini; fungo entomopatogênico; avaliações de risco.

ABSTRACT

Brazil is currently home to 259 species of stingless bees, including *Scaptotrigona postica*, known as mandaguari-preta. These organisms play a crucial role in the pollination of agricultural crops and other plants. However, it faces threats due to exposure to pesticides. Seeking more sustainable agricultural practices, the use of the *Beauveria bassiana* fungus as plant protection products has gained prominence, although its safety for bees is not yet fully understood. This study focused on evaluating the safety of the *B. bassiana*-based bioinsecticide on adult *S. postica* bees. The main objective was to determine the Lethal Dose (LD₅₀) and the Lethal Concentration (LC₅₀) of the bioinsecticide in different concentrations, by topical and oral exposure, validated by the positive control, the pesticide dimethoate, verifying and comparing with the company's data the viability and presence of viable conidia using microbiological techniques. Statistical analyzes employed a generalized binomial model to construct dose-response curves and non-parametric tests to assess the significance of concentrations in the negative control. Toxicity was more pronounced at a concentration of 20 µg/µL, being 100 times greater than that in the field, both through contact and ingestion, showing a correlation between concentration and probability of mortality. The estimated LD₅₀ for *B. bassiana* in relation to *S. postica* was 2,3900 µg a.i./bee, 11,95 times higher than the field dose. Similarly, the LC₅₀ was 2,9736 µg/µL, 14,87 times higher than the field concentration of 0,2 µg/µL. The bioinsecticide formulated with *B. bassiana* demonstrated high viability in a nutrient medium, guaranteeing its quality. The results suggest that, although higher concentrations of the commercial product based on *B. bassiana* present greater toxicity, it is possible to define safe levels for non-target organisms. This is fundamental to promoting agricultural sustainability and the preservation of bees, essential for healthy ecosystems and food security.

Keyword: Meliponini; entomopathogenic fungus; risk assessments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão lateral de <i>Scaptotrigona postica</i>	19
Figura 2 - Coleta das abelhas	20
Figura 3 - Câmara de Neubauer.....	24
Figura 4: Contador de colônias	25
Figura 5: Curva de dose-resposta da exposição tópica	32
Figura 6: Curva de dose-resposta da exposição oral.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mortalidade acumulada das abelhas <i>S. postica</i> após a exposição tópica à diluição seriada.	27
Tabela 2: Mortalidade acumulada das abelhas <i>S. postica</i> após a exposição oral.à diluição seriada	28
Tabela 3: Primeiro Teste Tópico da Subdose de Campo.....	29
Tabela 4: Segundo Teste Tópico da Subdose de Campo.....	29
Tabela 5: Primeiro Teste Oral da Subdose de Campo.....	30
Tabela 6: Segundo Teste Oral da Subdose de Campo.....	30
Tabela 7: Mortalidade acumulada das abelhas <i>S. postica</i> após a exposição tópica da concentração cem vezes acima a de campo.....	31
Tabela 8: Mortalidade acumulada das abelhas <i>S. postica</i> após a exposição oral em concentração cem vezes acima a de campo.....	31
Tabela 9: Teste de Tukey para comparação das médias de consumo.	34

LISTA DE SIGLAS

0,5xCC	Metade da concentração de campo (0,1 µg/ µL)
1,25xCC	Concentração 1,25 vezes maior que a de campo (0,25 µg/ µL)
1,9xCC	Concentração 1,9 vezes maior que a de campo (0,38 µg/ µL)
100xCC	Concentração 100 vezes maior que a de campo (20 µg/ µL)
2,9xCC	Concentração 2,9 vezes maior que a de campo (0,58 µg/ µL)
4,4xCC	Concentração 4,4 vezes maior que a de campo (0,88 µg/ µL)
6,65xCC	Concentração 6,65 vezes maior que a de campo (1,33 µg/ µL)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASAs	Abelhas e os Serviços Ambientais
CC	Concentração de campo (0,2 µg/ µL)
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CN	Controle negativo (0,0 µg/ µL)
CPO	Controle positivo oral (Dimetoato 0,18 µg i.a/abelha)
CPT	Controle positivo tópico (Dimetoato 0,16 µg i.a/abelha)
DL ₅₀	Dose Letal Média
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LAMAM	Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP	Manejo Integrado de Pragas
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PDA	Potato Dextrose Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Objetivo geral.....	17
	2.2 Objetivos específicos	17
3	HIPÓTESES E ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
	4.1 Material biológico.....	19
	4.2 Bioensaios de toxicidade	20
	4.2.1 Determinação da Dose Letal Média (DL ₅₀)	21
	4.2.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀)	21
	4.2.3 Preparo de concentração elevada	21
	4.2.4 Preparação do controle positivo dos experimentos	22
	4.3 Análise microbiológica do bioinseticida a base de fungo entomopatogênico.....	22
	4.3.1 Contagem em câmara de Neubauer.....	23
	4.3.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	24
	4.4 Análise estatística	25
5	RESULTADOS.....	27
	5.1 Determinação da DL ₅₀ e CL ₅₀	27
	5.2 Análises microbiológicas.....	35
6	DISCUSSÃO.....	35
7	CONCLUSÕES.....	38
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

A polinização é uma das etapas da reprodução das plantas com flores, e consiste no processo de transferência do pólen localizado nas anteras para o estigma das flores. (FAO, 2018; Klein *et al.*, 2020). Grande parte das espécies de plantas apresentam algum grau de dependência de animais para a sua reprodução e, conseqüentemente, para a formação de frutos (Vasques; Costa; Leite, 2023).

A polinização desempenha um papel fundamental em nossa biodiversidade, e também tem importância econômica, uma vez que a polinização ocorre, direta ou indiretamente, em 75% das principais plantas cultivadas. As abelhas são responsáveis por 66,3% dessa polinização, seguidas por besouros (9,2%), borboletas e mariposas (5,2% cada), aves e vespas (4,4% cada), moscas (2,8%), morcegos (2%) e hemípteros (0,4%) (BPBES/REBIPP, 2019). Esse processo de polinização é considerado um importante serviço ecossistêmico e representa grande parte da valoração econômica global (Costanza *et al.*, 1997).

Dentro da Política Nacional de Pagamento por Serviços Ambientais, instituída pela Lei nº 14.119/2021, o conceito de serviços ecossistêmicos engloba os benefícios diretos ou indiretos obtidos pelo homem a partir dos ecossistemas. São categorizados em serviços de provisão, regulação, culturais e de suporte (IPBES, 2016; Brasil, 2021). Os serviços de provisão compreendem os produtos obtidos dos ecossistemas, como alimentos, água e madeira para combustível. Os serviços de regulação são responsáveis pelas regulações de processos ecossistêmicos, incluindo a manutenção da qualidade do ar, do clima e a polinização. Já os serviços culturais abrangem a diversidade cultural, influenciando a geração de conhecimento, a espiritualidade, valores estéticos de paisagens (MEA, 2005). O serviço ecossistêmico desempenhado pelos polinizadores é considerado como de provisão, regulatório e cultural (BPBES/REBIPP, 2019).

Muito se tem discutido sobre o papel dos polinizadores, que contribuem para o rendimento das culturas, melhorando a qualidade dos frutos como tamanho, coloração e sabor, e a taxa de germinação das sementes produzidas, além de proporcionar uma variabilidade genética por meio da polinização entre plantas de uma mesma espécie (Vaissière; Freitas; Gemmill-Herren, 2011; Roubik, 2018; FAO, 2018;

BPBES/REBIPP, 2019;). De 191 plantas cultivadas e nativas que fazem parte da alimentação humana no Brasil, cerca de 91 dependem do serviço ecossistêmico de polinização prestado pelas abelhas, tais como o café (*Coffea arabica* L.), maracujá (*Passiflora edulis* Sims.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), cebola (*Allium cepa* L.), entre outros (BPBES, 2019).

A interação entre abelhas e agricultura influencia positivamente a produtividade de cultivares agrícolas em virtude dos serviços de polinização realizados por esses importantes insetos (Freitas; Nunes-Silva, 2012; BPBES/REBIPP, 2019). Pertencentes à ordem Hymenoptera (Michener, 2007), as abelhas possuem grande variedade de espécies, com aproximadamente 20.759 descritas até o momento (Informação verbal, 2023).

As abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini) são sociais e apresentam distribuição em ambientes de clima tropical e subtropical, sendo as principais visitantes de diversas culturas (Heard, 1999; Santos; Cruz-Landim, 2002). São abelhas com maior diversidade na região Neotropical (Kerr *et al.*, 1996). No Brasil são encontradas mais de 200 espécies, dentre elas a *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), polinizadora de plantas como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), café, jambolão (*Syzygium cumini* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.) maracujá, entre outras (BPBES/REBIPP, 2019). Conhecida popularmente como mandaguari-preta ou abelha-canudo-preta, seus adultos medem cerca de 6 mm e têm coloração castanha escura com pelos beges nas laterais do tórax e faixas no abdômen. Possuem comportamento defensivo, mas quando atacam, liberam um aroma lembrando cheiro de coco, uma característica comum do gênero *Scaptotrigona* (Costa, 2019).

Por sua presença em múltiplas culturas de interesse econômico ao homem, alguns fatores podem representar ameaças aos polinizadores, e conseqüentemente, ao processo de polinização, como o uso inadequado de agrotóxicos, ocasionando mortalidade das abelhas em doses acima do recomendado, e conseqüentemente, o declínio populacional, ou em caso de doses subletais, alterações morfológicas em larvas, ou de funcionalidades em abelhas adultas, como alterações cognitivas e supressão do sistema imune (Frazier *et al.*, 2008; Whitehorn *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2016; Dorigo *et al.*, 2019; Nath; Singh; Mukherjee, 2022; Antunes *et al.*, 2023).

O uso de agrotóxicos começou nas grandes guerras como armas químicas, mas logo se popularizou como um grande aliado no manejo de pragas, associado a outras tecnologias para propagação em alta escala desses produtos nas lavouras

(Londres, 2011). O conceito mais conhecido de controle de pragas é o de um conjunto de ações para evitar, remediar ou retardar a perda de produção causada a nível econômico, indo além dos insetos, incluindo também ervas daninhas, agentes patogênicos e animais não artrópodes (Kogan, 1998).

Durante a década de 1950 a 1960, a Revolução Verde surge como um método que consistia em suprir as necessidades do consumo em larga escala, por conta da expansão populacional, com estudos sobre melhoramento genético das plantas, novas tecnologias no setor agrícola, que por consequência trouxeram maior volume de produção e menores perdas por meio do controle de pragas utilizando agrotóxicos (Borlaug, 2000; Londres, 2011; Paschoal, 2019).

Porém, ao longo dos anos, notou-se que a exposição humana aos agrotóxicos durante sua aplicação poderia oferecer riscos em curto e longo prazo, ocasionando desde dores de cabeça até problemas imunológicos (Domenico; Giacomet; Mascarenhas, 2022).

Por isso, tornou-se imprescindível o estabelecimento de métodos mais seguros de avaliação de risco dessas substâncias (IBAMA, 2018), uma vez que são utilizados para organizar, de forma sistemática, dados, informações, pressupostos e incertezas que ajudem a entender e prever quais as relações entre um estressor e seus efeitos ecológicos, de maneira que seja útil na tomada de decisões (Cham *et al.*, 2017).

Os estudos de toxicidade têm como intuito verificar se esses compostos podem causar efeitos adversos em um organismo, por meio de testes ecotoxicológicos. Quando o parâmetro na avaliação é a mortalidade, o resultado do teste pode ser expresso pela CL_{50} (Concentração Letal Média) ou DL_{50} (Dose Letal Média) que representam uma concentração ou dose de um ingrediente ativo capaz de causar a mortalidade de 50% da população amostral. Tanto a CL_{50} como a DL_{50} agudas são parâmetros de toxicidade obtidos a partir de bioensaios e sua relação dose-resposta, sendo de curta duração, de no máximo 96 horas, onde se observa o efeito de uma única exposição a uma dose do agente estressor (Cham *et al.*, 2017).

O manejo integrado de pragas (MIP) surgiu como uma alternativa interessante, pois nele não é utilizado somente um método de controle de pragas nas culturas, mas integrando componentes como a avaliação do agroecossistema para a tomada de decisão sobre o método de controle da praga presente, seja por combinação de meio químico, biológico, rotação de cultura, de forma que preserve a

saúde humana e ambiental (Picanço, 2010; Paschoal, 2019). A inserção de meios mais sustentáveis para o controle de pragas nas culturas pelo mundo de forma mais estratégica, torna os produtos de controle biológico mais evidentes, exercendo um papel chave dentro do MIP (Toledo-Hernández *et al.*, 2016; Baker; Green; Loker, 2020).

O controle biológico pode ocorrer de forma natural em qualquer ambiente, não necessitando da ação do homem, porém, ele pode ser manipulado de forma que seja mais economicamente conveniente (Fontes *et al.*, 2020). Neste cenário, o controle biológico pode trazer o uso de predadores, parasitoides e patógenos para controle de pragas (Van Lenteren; Woets, 1988).

Devido ao crescimento da circulação de produtos de proteção às plantas com base em bioinsumos, diversos órgãos governamentais pelo mundo criaram diretrizes quanto ao registro de produtos e a divulgação de seus ingredientes ativos, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a Organização Mundial de Saúde e, no Brasil, os responsáveis são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Por meio destes órgãos regulamentadores, é estudada a interação dos produtos de controle de pragas no escopo de impactos ambientais, saúde humana e eficiência agrônômica. E pelos produtos de controle biológico serem considerados de baixa toxicidade e de uso seguro na agricultura orgânica, sua via de aprovação é chamada de via dos orgânicos (MAPA, 2023).

O MAPA estabeleceu juntamente com o IBAMA e a ANVISA um conjunto de normas para registro de produtos utilizados como controle biológico de pragas que prioriza na identificação da embalagem a sua segurança no uso da agricultura orgânica, com seus componentes muito bem testados e conhecidos para o equilíbrio do sistema e aumento da resistência das plantas, não somente eliminando a praga em questão. Também efetua a fiscalização e apreensão de produtos biológicos que não atendem a estes requisitos, tendo mais recentemente uma fiscalização em massa junto a Polícia Rodoviária Federal, para apreensão de microrganismos fracionados a fertilizantes, todos produzidos sem os devidos cuidados e registros competentes, dentre eles o fungo *Beauveria bassiana* (BRASIL, 2011; PRF, 2023).

O fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, considerado seguro para a agricultura orgânica, desempenha um papel essencial no controle biológico, atuando como um inseticida para o controle de pragas como a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) e da mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.), que têm sido responsáveis por causar perdas econômicas significativas em várias culturas de importância econômica no estado de São Paulo, incluindo o algodão (*Gossypium* sp.) (Hilje e Morales, 2008; Koppert, 2023) e o café que depende, em certo grau, da polinização realizada pelas abelhas (Esquivel; Coulson; Brewer, 2020).

Os fungos do gênero *Beauveria* são conhecidos por suas colônias de coloração branca, variando ocasionalmente para tons amarelados e rosados. Suas células podem se apresentar de forma isolada ou em agrupamentos, o qual são chamados de conídios, e possuem formato elipsoidal, com tamanho de 2,5 a 4,5 µm (Trabulsi; Alterthum, 2015). Sua estrutura apresenta proteínas conhecidas como hidrofobinas, que contribuem na adesão e patogenicidade, alterando a hidrofobicidade da parede celular e formando estruturas chamadas hifas. Estas estendem-se pela endocutícula do hospedeiro lateralmente e em 10 dias, os insetos alvo são encobertos por um micélio branco, que esporula sob condições favoráveis de temperatura e umidade e leva o hospedeiro à morte pela dificuldade em se alimentar e locomover (Zimmerman, 2007; Fontes *et al.*, 2020). Porém, os estudos acerca das interações entre as abelhas e os fungos ainda são limitados (Omuse *et al.*, 2022).

A interação entre os fungos e as abelhas foi mais bem estudada em relação à *Apis mellifera*. Em relação às abelhas sem ferrão, Menezes *et al.* (2015), relataram relações mutualísticas envolvendo a espécie sem ferrão *Scaptotrigona depilis* e um fungo pertencente ao gênero *Monascus* (Ascomycotina), importante no desenvolvimento larval. O estudo desenvolvido por Paludo *et al.* (2018), demonstrou que o fungo em questão era do gênero *Zygosaccharomyces* e elucidou seu importante papel no desenvolvimento das abelhas. Além do pólen e do mel, as larvas necessitam de esteróis do tipo ergosterol, que é efetivamente sintetizado por esse fungo, como base para sintetizar o hormônio de muda. Em algumas espécies de abelhas, como *Tetragona clavipes* e *Melipona flavolineata*, as células fúngicas são essenciais para o desenvolvimento, pois o fungo se prolifera nessas células antes da eclosão dos ovos e é consumido pelas larvas até atingirem três dias de idade (Menezes *et al.*, 2013).

A existência de uma microbiota significativa dentro das colmeias, seja benéfica ou patogênica, destaca a importância de avaliar os possíveis efeitos dos

produtos de controle biológico à base de microrganismos, como os fungos, quando exposto às abelhas. Em um estudo conduzido por Peng *et al.* (2020), foi realizada uma avaliação da segurança de inseticidas biológicos, com foco em *B. bassiana*. Nesse estudo, simulou-se a contaminação de *Apis mellifera* por meio do contato com o fungo em sua fonte de alimento. As forrageiras foram afetadas pela micose e morreram em um tempo médio de 10 dias, quando expostas à temperatura de 25°C, considerada ideal para o desenvolvimento e infecção dos conídios.

É importante ressaltar que não foram observadas contaminações secundárias na colmeia, uma vez que as abelhas possuem um sistema de limpeza eficiente, removendo as forrageiras contaminadas poucos minutos após sua morte. Cappa *et al.* (2019) demonstraram que a exposição das forrageiras a *B. bassiana* afetou a capacidade de reconhecimento das guardas de *A. mellifera*, resultando em um impacto significativo no reconhecimento das companheiras expostas.

A exposição a fungos entomopatogênicos pode afetar o comportamento da colmeia, como foi o caso de *Tetragonisca angustula*, também conhecida como “jataí”, onde foi testado se as abelhas expostas topicamente a *B. bassiana* poderiam ser barradas na entrada da colmeia. A rejeição pelas guardas é estatisticamente semelhante ao caso de uma abelha de outra colmeia tentar adentrar a colônia sendo um dos meios de detecção as alterações cuticulares após exposição (Almeida *et al.*, 2015). Também foi constatado a potencial toxicidade desse fungo em exposição tópica e oral para *S. depilis* e *T. angustula*, reforçando que mesmo sendo considerados organismos de baixa toxicidade, os fungos entomopatogênicos podem atingir organismos não-alvo (Leite *et al.*, 2022).

Estudos como estes evidenciam a necessidade de testar a segurança dos organismos para controle biológico em organismos não-alvo, pois pouco se sabe com relação a diversas espécies de abelhas nativas, assunto sobre o qual este estudo se propôs a contribuir.

Para realizar os testes, alguns parâmetros precisam ser atendidos, como o uso de um controle positivo à base do ingrediente ativo de um inseticida químico modelo para testes de toxicidade. Conforme proposto pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), o organofosforado conhecido como dimetoato é o ingrediente ativo padrão. Utilizado na agricultura e até mesmo na jardinagem, o dimetoato é facilmente diluído em água ou solventes orgânicos, sendo

extremamente tóxico para as abelhas, mesmo quando expostas em doses subletais (Gough; McIndoe; Lewis, 1994).

Portanto, na busca para contribuir com uma agricultura mais sustentável e na preservação dos polinizadores, atendendo aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas: 2 (Fome Zero), por meio de práticas agrícolas sustentáveis e 15 (Vida Terrestre), o presente projeto propôs contribuir com informações sobre a segurança no uso de um produto formulado a base do fungo entomopatogênico *B. bassiana* para a espécie sem ferrão *S. postica*, comparando com os dados de toxicidade do dimetoato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a segurança do bioinseticida à base de *Beauveria bassiana*, cepa PL 63 para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a possível toxicidade do bioinseticida à base de *B. bassiana* por meio da determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) e Concentração Letal Média (CL₅₀) para abelhas adultas de *S. postica* por via tópica e oral;
- Validar os dados experimentais referentes ao produto biológico com o controle positivo padrão, o inseticida dimetoato;
- Quantificar a viabilidade dos conídios do produto formulado, comparando com os dados referidos em bula.

3 HIPÓTESES E ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O presente estudo buscou avaliar a segurança do produto comercial à base do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, considerando a aplicabilidade na realidade de campo. A estruturação da dissertação partiu das seguintes hipóteses:

Hipótese nula (H0): O fungo presente no bioinseticida não causa mortalidade significativa para as abelhas nos parâmetros testados, com os dados adquiridos nesse experimento, corrobora sua segurança para utilização em campo;

Hipótese alternativa (H1): O fungo presente no bioinseticida causa mortalidade significativa para as abelhas, indicando possíveis riscos associados ao seu uso. Além disso, a viabilidade dos esporos foi testada em laboratório, verificando a qualidade do produto.

A abordagem metodológica permitiu testar as interações entre o fungo e as abelhas em condições controladas de laboratório, em concordância com a premissa da aplicação prática em campo, a concentração de 0,2 µg/ µL foi embasada no controle da mosca branca em cultura de algodão, o que garante a exploração das conclusões em situações reais de uso. Além da avaliação de mortalidade das abelhas, outro aspecto do estudo foi a análise da viabilidade dos conídios presentes no produto comercial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

As abelhas *S. postica* (Figura 1) foram coletadas de três diferentes colmeias do meliponário do Grupo de Estudos e Pesquisas “Abelhas e os Serviços Ambientais”, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar). Para a coleta, foram selecionadas colmeias saudáveis, seguindo um protocolo adaptado por Nocelli *et al.* (2018) (Projeto CNPq 400540/2018-5) para abelhas sem ferrão, em conformidade com as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 1998). Foram utilizadas colmeias não-irmãs ao montar os grupos experimentais, visando assegurar a variabilidade genética.

Figura 1 - Visão lateral de *Scaptotrigona postica*



Fonte: Fototeca Cristiano Menezes (FCM).

Os bioensaios foram conduzidos no laboratório de Biologia de Polinizadores do CCA/UFSCar. Cada grupo experimental consistiu em 30 abelhas (10 de cada colmeia), selecionadas aleatoriamente na saída das colmeias e colocadas em gaiolas experimentais compostas por potes plásticos de 250 mL (9 cm de diâmetro x 7 cm de altura) (Figura 2), com furos nas laterais e tampa para ventilação, além de furos mais largos na tampa para acoplamento do alimentador e outro para manejo de abelhas mortas. Após a coleta, um tubo plástico contendo xarope de água e açúcar

crystal, na proporção 1:1 (m/v), foi disponibilizado *ad libitum* para as abelhas. Em seguida, as abelhas foram transferidas para o laboratório, onde permaneceram em adaptação por 24 horas antes da realização dos experimentos.

Figura 2 - Coleta das abelhas



Fonte: Autoria própria.

4.2 Bioensaios de toxicidade

A dosagem máxima recomendada pelo fabricante do produto comercial para o controle de *B. tabaci* consiste em aplicar 1 kg do produto para se obter uma concentração de 5% de *B. bassiana* cepa PL 63, em um volume de calda total de 250 litros por hectare.

Transportando os dados acima para os bioensaios em laboratório, preparou-se a solução estoque com uma diluição de 10 mL de água destilada para os ensaios de contato e xarope para a exposição oral, resultando em uma concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, considerada 10 vezes maior que a concentração de campo (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A partir desta solução, uma subdose foi preparada, sendo de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0,5xCC), e também diluições seriadas calculadas em um fatorial de 1,5, para obter as concentrações específicas de 1,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (6,65xCC), 0,88 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (4,4xCC), 0,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

μL (2,9xCC), 0,38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1,9xCC) e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1,25xCC), que respectivamente representam 6,65, 4,4, 2,9, 1,9 e 1,25 vezes maior a concentração de campo de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.2.1 Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀)

Após a coleta, as abelhas foram anestesiadas dentro de suas gaiolas por meio de resfriamento em freezer comum, a uma temperatura de (-20 °C) por 40 a 45 segundos, de acordo com a massa corporal de *S. postica*. Em seguida, as abelhas foram dispostas em papel alumínio para a aplicação do bioinseticida à base de *B. bassiana*.

As abelhas do grupo experimental receberam 1 μL da solução teste na parte dorsal do tórax. As abelhas do grupo controle receberam 1 μL de água destilada. Todas as abelhas testadas foram acondicionadas em suas gaiolas e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) em temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$ e com umidade relativa do ar em $70\pm 10\%$. As abelhas mortas foram contabilizadas a cada 24 horas até o máximo de 96 h para posterior análise estatística.

4.2.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀)

Para simulação do consumo de pólen e néctar contaminado dentro da colmeia, os procedimentos para a determinação da CL₅₀ oral seguiram o protocolo proposto por Nocelli *et al.* (2018) (Projeto CNPq 400540/2018-5). Na preparação dos ensaios, utilizamos as mesmas concentrações e métodos de preparo descritos no item anterior.

Após a coleta e acondicionamento nas gaiolas, foi fornecido às abelhas dos grupos experimentais o xarope de água e açúcar cristal, na proporção 1:1 (m/v), *ad libitum* contendo as concentrações descritas no item 4.2, e para o grupo controle o alimento ausente de *B. bassiana*. Os alimentadores foram trocados e pesados diariamente para o cálculo de consumo. As abelhas foram observadas a cada 24 horas até 96 horas e as mortes contabilizadas para posterior análise estatística.

4.2.3 Preparo de concentração elevada

Por se tratar de um composto pouco testado em abelhas sem ferrão, e que apresentou baixa mortalidade nos testes para a determinação de DL₅₀ e CL₅₀, optou-

se por testar uma dose de 20 µg/ µL (100xCC), considerada 100 vezes maior que a dose de campo recomendada em bula, ainda sim dentro da concentração limite de 100 µg/ µL preconizada pela diretriz nº 425 de Teste-limite da OCDE (2022), seguindo o mesmo protocolo adaptado para abelhas sem ferrão.

4.2.4 Preparação do controle positivo dos experimentos

Para validar o experimento, seguindo as diretrizes da OCDE (1998a, 1998b), foi utilizado o ingrediente ativo dimetoato (98% de pureza) como controle positivo (CP). Inicialmente, preparou-se uma solução estoque da substância de 10000 µg/µL de água destilada. Em seguida foi feita uma diluição seriada em água destilada para exposição tópica até a concentração de 0,16 µg i.a/abelha e em xarope para exposição oral a concentração de 0,18 µg i.a/abelha, que são concentrações suficientes para ocorrer a mortalidade em *Apis mellifera*, conforme sugerido por Gough, McIndoe e Lewis (1994).

4.3 Análise microbiológica do bioinseticida a base de fungo entomopatogênico

Para embasar as análises microbiológicas, foi adotada uma estratégia de seleção de um subconjunto representativo das diversas concentrações utilizadas ao longo do mestrado. Essa seleção foi orientada pela utilização consciente dos recursos disponíveis, considerando a ampla variedade de concentrações utilizadas ao longo da pesquisa. Com isso, foram escolhidas concentrações que abrangeram diferentes níveis de exposição, incluindo uma concentração próxima à realidade de aplicação em campo, que serviu como referência comparativa, permitindo relacionar os resultados com informações disponíveis na literatura científica e nas instruções do fabricante. Além disso, também foram selecionadas concentrações distintas, sendo uma subdose a concentração de campo (0,1 µg/ µL) e uma concentração elevada (20 µg/ µL).

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Araras/SP. Todos os materiais utilizados (Erlenmeyer, Becker 250 mL, tubos de ensaio, colher dosadora e placas de Petri de vidro) foram autoclavados por 15 minutos, e a câmara de fluxo laminar foi esterilizada com luz UV por 15 minutos.

Foram pesados 9,75 g de Potato Dextrose Agar (PDA) para preparo de solução nutritiva em 250 mL de água destilada, também autoclavada por 15 minutos, e o antibiótico Tetraciclina foi adicionado quando a solução atingiu temperatura ambiente, antes do meio se solidificar. A diluição seriada, iniciou-se a partir da solução de campo até a diluição de 10^6 . Essa diluição máxima foi escolhida para buscar um equilíbrio entre a densidade de colônias, entre 30 e 300 colônias, e a facilidade de contagem nos cultivos. Ao atingir a diluição 10^6 , buscou-se evitar concentrações excessivamente baixas que poderiam resultar em um número insuficiente de colônias para análise, bem como evitar concentrações excessivamente altas, que tornaram difícil a contagem precisa devido à sobreposição das colônias. Essa escolha é usual na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e permitiu maximizar a sensibilidade da contagem e minimizar os erros associados à análise, assegurando resultados confiáveis e representativos da viabilidade dos esporos presentes no bioinseticida.

Para os plaqueamentos, foi inoculado 0,1 μ L da diluição em cada placa, em triplicatas, sobre o meio nutritivo e espalhada por toda superfície utilizando uma alça de Drigalski estéril, seguindo o método *spread plate* (Wise, 2006). As placas foram incubadas a 28° C em B.O.D. O crescimento em cada placa foi monitorado durante 24 horas durante 96 horas.

Foram necessárias três repetições do plaqueamento do bioinseticida devido a ocorrência de contaminação cruzada no meio de cultura. Suspeita-se que essa contaminação tenha ocorrido durante o processo de incubação na B.O.D. do LAMAM. Com o intuito de contornar esse problema, optou-se por substituir as placas de Petri de vidro por placas estéreis e descartáveis. Após a inoculação do fungo, as placas foram cuidadosamente acondicionadas na B.O.D. do laboratório do Grupo ASAs, evitando-se qualquer outra interferência durante o processo.

4.3.1 Contagem em câmara de Neubauer

Para ajustar a presença de fungos e garantir a presença dos conídios nas quantidades previstas nas suspensões utilizadas nos testes de toxicidade tópica e oral, foi necessária a contagem de esporos totais pela câmara de Neubauer em microscopia de luz sem uso de corantes.

A câmara de Neubauer consiste em uma placa retangular de vidro, com volume definido ($0,1 \text{ mm}^3$) da grade micrométrica gravada em sua superfície inferior

(Figura 3). A estrutura da câmara, observada em microscópio de luz, possibilita a contagem precisa de partículas ou células presentes na suspensão. Como a câmara possui dimensões padronizadas, é possível determinar com precisão o volume de suspensão contido em cada câmara, o que permite os cálculos de concentração.

Figura 3 - Câmara de Neubauer



Fonte: Site Instrumentalia.

No procedimento de contagem em câmara de Neubauer para a análise de conídios totais, uma amostra da suspensão contendo os conídios é carregada em uma das extremidades da câmara, preenchendo as câmaras de contagem da grade. A gravidade e a capilaridade se encarregam de espalhar a suspensão uniformemente por toda a área das câmaras.

As câmaras de contagem na câmara de Neubauer são subdivididas em quadrantes menores, permitindo que se contabilize o número de partículas em uma área específica e, a partir disso, se calcule a concentração da amostra.

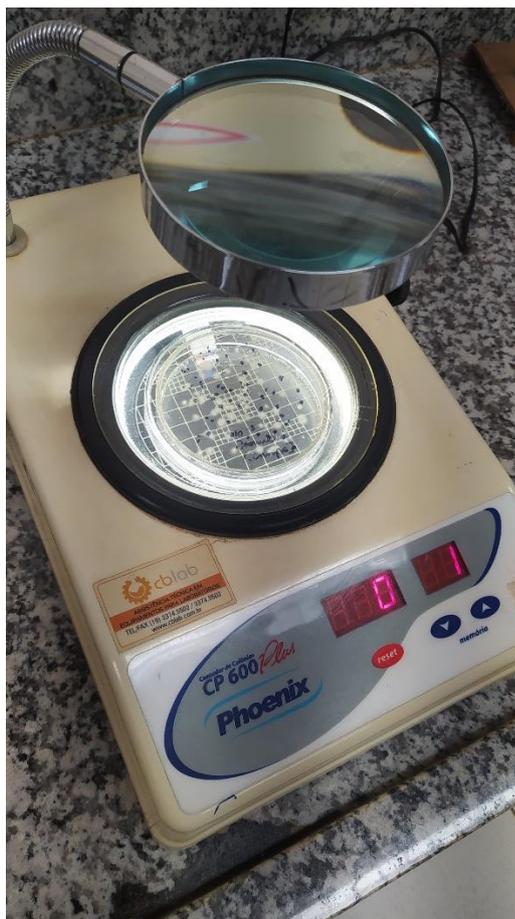
4.3.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após 96 horas da inoculação dos fungos em meio nutritivo, realizou-se a contagem para verificar a quantidade de conídios viáveis, excluindo casos em que as placas apresentaram alta viabilidade, devido à dificuldade em contar as colônias mais isoladas.

Para avaliar a viabilidade dos conídios utilizados nos experimentos, procedeu-se a contagem direta das colônias nas placas de Petri após 96 horas da inoculação da solução contendo o fungo. Essa contagem foi realizada em triplicata para a concentração de campo, subdose e concentração elevada.

Cada placa com as concentrações testadas foi observada em um aparelho contador de colônias (Figura 4), sendo demarcado com caneta permanente cada colônia para facilitar a contagem, para comparação dos valores com os esporos totais visualizados na câmara de Neubauer.

Figura 4: Contador de colônias



Fonte: Autoria própria.

4.4 Análise estatística

A escolha dos modelos estatísticos seguiu a abordagem inicial para a determinação de uma DL_{50} e CL_{50} . nas diferentes concentrações do produto formulado a base do fungo entomopatogênico. Os testes realizados com as concentrações de $1,33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0,88 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0,58 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0,38 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ não apresentaram uma taxa de mortalidade estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (CN) nas duas vias de exposição, não sendo possível obter uma curva de dose-resposta nos moldes estatísticos.

Para validação dos resultados de não mortalidade, o qual não seguia uma distribuição normal, foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (1952) para comparar as taxas de mortalidade das diferentes concentrações e comparadas entre si por meio do teste de Wilcoxon (1945) com ajuste de Bonferroni, quando os parâmetros não foram atingidos.

Diante dos resultados iniciais, novos testes foram realizados com uma concentração de 20 µg/ µL, 100 vezes maior que a de campo, respeitando o parâmetro dentro do protocolo internacional proposto pela OCDE (2022) de uma concentração limite de até 100 µg/ µL. Para conseguirmos estipular uma curva de resposta, os dados desse experimento foram submetidos à análise pelo Modelo Binomial Generalizado, que considera os dados nas proporções de aplicação de uma substância a n indivíduos, ajustando os dados por meio da extensão c-loglog (Cordeiro; Demétrio, 2013).

Os dados referentes ao consumo durante a exposição por via oral foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância das diferenças entre as concentrações testadas e consumo (Ferenc; Foran, 2000). Posteriormente, as diferenças significativas foram validadas por meio do teste de Tukey.

Todos os testes foram realizados pelo R Core Team (2020), respeitando-se o intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da DL₅₀ e CL₅₀

Ao examinar as concentrações 1,25xCC, 1,9xCC, 2,9xCC, 4,4xCC e 6,65xCC, o teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças significativas nas taxas de mortalidade entre essas concentrações em relação ao controle negativo (CN) (df = 1; p = 0,4159 > 0,05) (Tabelas 1 e 2), o que impulsionou a realização dos testes com uma concentração mais elevada (100xCC) e outra de subdose a dose de campo (0,5xCC).

Tabela 1: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição tópica, o qual foi aplicado 1µL de água destilada no tórax para o controle negativo (CN), dimetoato para controle positivo (CPT) e *B. bassiana* em concentrações 1,25; 1,9; 2,9; 4,4 e 6,65 vezes acima da dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	0	0	0,00
CPT	30	30	30	30	30	0,00
1,25xCC	30	1	1	1	1	0,00
1,9xCC	30	2	6	13	13	0,15
2,9xCC	30	2	5	6	6	0,06
4,4xCC	30	0	0	1	4	0,05
6,65xCC	30	0	1	1	2	0,02

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Tabela 2: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição oral contendo xarope de água e açúcar como controle negativo (CN), xarope contaminado com dimetoato para controle positivo (CPO) e *B. bassiana* em concentrações 1,25; 1,9; 2,9; 4,4 e 6,65 vezes acima da dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	0	0	0,00
CPO	30	2	29	30	30	0,40
1,25xCC	30	3	3	14	15	0,19
1,9xCC	30	1	1	1	1	0,00
2,9xCC	30	4	6	6	8	0,05
4,4xCC	30	4	6	6	8	0,05
6,65xCC	30	2	3	3	3	0,02

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

No primeiro teste com a subdose de campo 0,5xCC, uma réplica da exposição tópica apresentou mortalidade em todos os indivíduos, mas essa mortalidade não foi estatisticamente significativa ($df = 2$; $p = 0,3173 > 0,05$) (Tabela 3). Esse resultado levou a repetição do experimento, que também não apresentou mortalidade significativa ($df = 2$; $p = 0,3679 > 0,05$) (Tabela 4). Em relação à exposição oral, as taxas de mortalidade foram baixas, com 4 indivíduos no primeiro teste e 5 no segundo teste após 96 horas (Tabelas 5 e 6), indicando a segurança do produto comercial formulado à base de *B. bassiana* para *S. postica* dentro dessas condições experimentais, tanto exposição via tópica e oral.

Tabela 3: Primeiro Teste Tópico da Subdose de Campo: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição tópica, o qual foi aplicado 1µL de água destilada no tórax para o controle negativo (CN), dimetoato para controle positivo (CPT) e *B. bassiana* em subdose da dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	1	1	0,02
CPT	30	30	30	30	30	0,00
0,5xCC	30	7	8	12	15	0,11

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Tabela 4: Segundo Teste Tópico da Subdose de Campo: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição tópica, o qual foi aplicado 1µL de água destilada no tórax para o controle negativo (CN), dimetoato para controle positivo (CPT) e *B. bassiana* em subdose da dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	3	3	0,05
CPT	30	30	30	30	30	0,00
0,5xCC	30	7	8	9	15	0,11

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Tabela 5: Primeiro Teste Oral da Subdose de Campo: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição oral contendo xarope de água e açúcar como controle negativo (CN), xarope contaminado com dimetoato para controle positivo (CPO) e *B. bassiana* em subdose à dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	1	1	0,02
CPO	30	2	29	30	30	0,40
0,5xCC	30	1	1	3	4	0,04

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Tabela 6: Segundo Teste Oral da Subdose de Campo: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição oral contendo xarope de água e açúcar como controle negativo (CN), xarope contaminado com dimetoato para controle positivo (CPO) e *B. bassiana* em subdose à dose de campo (0,2 µg/ µL) entre 24 e 96 horas.

Concentração (µg/ µL)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	3	3	0,05
CPO	30	2	29	30	30	0,40
0,5xCC	30	1	1	4	5	0,06

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Quanto à concentração de 20 µg/µL, considerada 100 vezes maior que a de campo (0,2 µg/µL), observou-se a mortalidade de todos os indivíduos em 24 horas nas vias tópica e oral (Tabelas 7 e 8). No entanto, a análise estatística, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, não revelou variações significativas nas taxas de mortalidade nessas condições experimentais, resultando em uma diferença não significativa (df = 1; p = 0,3173 > 0,05). As comparações múltiplas de Wilcoxon, com ajustes de Bonferroni, confirmaram uma diferença significativa dos níveis de concentração entre o controle e a concentração de 20 µg/µL (p = 0,025 < 0,05).

Tabela 7: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição tópica, o qual foi aplicado 1 μ L de água destilada no tórax para o controle negativo (CN), dimetoato para controle positivo (CPT) e *B. bassiana* em concentração cem vezes acima a concentração de campo (0,2 μ g/ μ L) entre 24 e 96 horas.

Concentração (μ g/ μ L)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	0	0	0,00
CPT	30	30	30	30	30	0,00
100xCC	30	30	30	30	30	0,00

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Tabela 8: Mortalidade acumulada das abelhas *S. postica* após a exposição oral contendo xarope de água e açúcar como controle negativo, xarope contaminado com dimetoato para controle positivo e *B. bassiana* em concentração cem vezes acima da concentração de campo (0,2 μ g/ μ L) entre 24 e 96 horas.

Concentração (μ g/ μ L)	Número amostral	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Desvio Padrão
CN	30	0	0	0	0	0,00
CPO	30	2	29	30	30	0,40
100xCC	30	30	30	30	30	0,00

Os valores apresentados representam a quantidade de indivíduos mortos (\pm desvio padrão) para cada concentração após 24, 48, 72 e 96 horas com 30 abelhas expostas por concentração. Fonte: autoria própria.

Todas as concentrações de *B. bassiana* utilizadas neste estudo (0,01; 0,25, 0,38; 0,58; 0,88; 1,33 e 20 μ g/ μ L) foram submetidas a aplicação de um teste estatístico de regressão linear para estipular a Dose Letal Média (DL₅₀) e outro mais robusto, o Modelo Binomial Generalizado para encontrar a Concentração Letal Média (CL₅₀) por meio da extensão c-loglog, permitindo a construção de uma curva de dose-resposta. A DL₅₀ encontrada foi de 2,3900 μ g i.a/abelha, 11,95 vezes maior que a dose de campo e uma CL₅₀ de 2,9736 μ g/ μ L, 14,87 vezes maior que a concentração de campo de *B. bassiana* para a abelha *S. postica*. Essas comparações demonstram que as concentrações utilizadas na maioria dos testes foram consideravelmente acima da concentração de aplicação em condições reais de campo.

A análise estatística revelou uma relação exponencial no modelo loglog, indicando que o aumento da concentração do fungo está associado a uma maior probabilidade estimada de mortalidade das abelhas (Figuras 5 e 6).

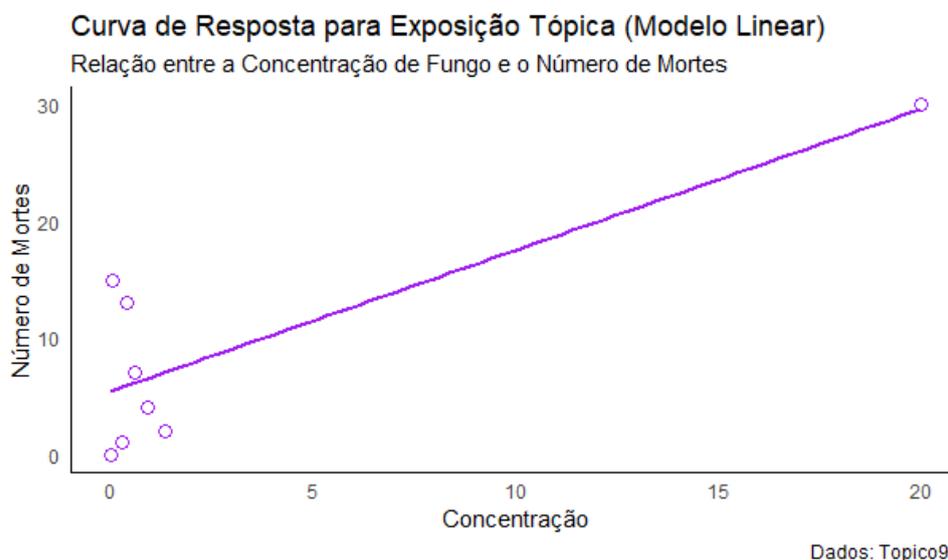


Figura 5: Curva de dose-resposta da exposição tópica nas concentrações de 0,01; 0,25; 0,38; 0,58; 0,88; 1,33 e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *B. bassiana*, ajustada para o modelo c-loglog. O modelo c-loglog mostra como a probabilidade de sobrevivência com o aumento da concentração, demonstrando como a probabilidade de sobrevivência das abelhas diminui conforme a concentração aumenta.

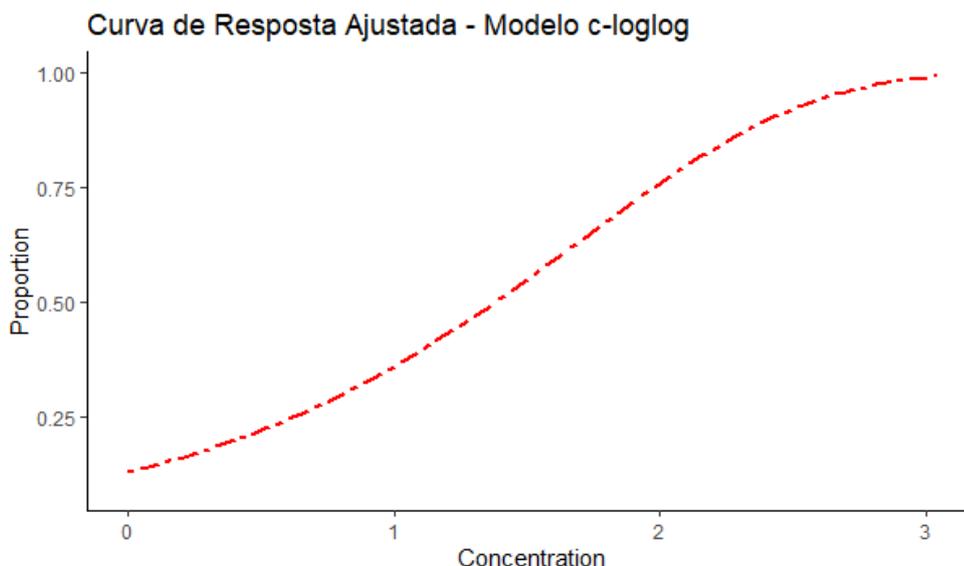


Figura 6: Curva de dose-resposta da exposição oral às concentrações de 0,01; 0,25; 0,38; 0,58; 0,88; 1,33 e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ajustada para o modelo c-loglog. A curva representa uma relação entre *B. bassiana* e a probabilidade de sobrevivência de *S. postica*. O modelo c-loglog mostra como a probabilidade de sobrevivência com o aumento da concentração, seguindo uma função de log-logística, demonstrando como a probabilidade de sobrevivência das abelhas diminui conforme a concentração aumenta.

Com relação ao cálculo de consumo das diferentes concentrações administradas por via oral durante todos os ensaios, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que o consumo das abelhas apresentou significância estatística ($p = 0,0065 < 0,05$).

Ao empregar o teste de Tukey para avaliar as diferenças entre o consumo nas diversas concentrações (Tabela 9), os resultados obtidos indicaram o seguinte padrão: não foram identificadas diferenças significativas entre as concentrações do controle, 0,38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Da mesma forma, as concentrações de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,88 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 1,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ também não apresentaram diferenças significativas entre si, mas diferem do grupo da concentração de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabela 9: Teste de Tukey para comparação das médias de consumo do xarope de água e açúcar como controle negativo e ao xarope contaminado por *B. bassiana* para a abelha sem ferrão *S. postica*, entre as concentrações contendo metade da dose de campo; 1,25; 1,9; 2,9; 4,4; 6,65 e cem vezes acima da dose de campo (0,2 µg/ µL).

Concentrações (µg/µL)	Consumo (gramas)	Diferenças significativas
0,00	3,362	a
0,38	3,204	a
0,58	3,134	a
1,33	3,055	ab
0,25	2,992	ab
0,88	2,905	ab
0,01	2,016	ab
20,00	1,522	b

Os dados foram organizados de acordo com as diferenças significativas entre os grupos. Para cada grupo de concentrações, são apresentadas as médias de consumo, seguido da média de consumo acompanhadas pelo intervalo de confiança de 95%. As diferenças significativas são representadas pelas letras minúsculas a, b e c, sendo que letras iguais indicam uma ausência de diferença significativa entre os grupos. Fonte: autoria própria.

Enquanto que na concentração mais elevada de 20 µg/µL difere de todos os grupos mencionados anteriormente. Dentro do padrão de tempo dos bioensaios conduzidos foi o tempo máximo de observação 96 horas, nesta concentração houve a mortalidade total das abelhas expostas em 24 horas.

A validação para todos os testes foi realizada pelo uso de um controle positivo, sendo este o dimetoato, que ocasionou a mortandade de todos os indivíduos pela exposição tópica e oral. Além disso, a mortalidade dos indivíduos do grupo controle foi inferior a 10%, garantindo a qualidade e confiabilidade dos testes executados durante todo o período deste projeto.

5.2 Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas para avaliar a presença dos conídios totais na concentração de campo, na subdose e na dose mais elevada, os ajustes realizados por meio câmara de Neubauer indicaram as seguintes quantidades de conídios: na concentração de campo de 0,2 µg/ µL, foram registrados $8,38 \times 10^6$; na subdose equivalente à metade da concentração de campo, observou-se a presença de $0,57 \times 10^7$ conídios/mL; e na concentração de 20 µg/ µL, foram contabilizados $7,15 \times 10^7$ conídios/mL.

Na concentração de campo (0,2 µg/ µL), após uma diluição de 10^{-3} , obteve-se uma média de 176 conídios viáveis em 1 mL, com valores individuais de 190, 172 e 168 colônias. Da mesma forma, para a concentração de 0,1 µg/ µL, também após a diluição de 10^{-3} , a média foi de 124 conídios viáveis em 1 mL, com resultados individuais de 130, 115 e 128 colônias. Já na concentração de 20 µg/ µL, com uma diluição de 10^{-4} , a média foi de 271 conídios viáveis em 1 mL, com resultados individuais de 287, 268 e 258 colônias.

Para fins de comparação com os dados constantes na bula do fabricante, que estipulam um mínimo de 1×10^8 conídios viáveis por grama, procedemos a conversão dos valores obtidos. A concentração correspondente ao produto comercial, quando convertido na unidade de medida para este estudo e da literatura científica, possui 1×10^8 conídios/mL. Na concentração de campo, resultou-se em um valor de $1,0475 \times 10^8$ conídios viáveis/mL. Na subdose a dose de campo, observou-se a presença de $5,7 \times 10^6$ conídios viáveis/mL, enquanto que na concentração de 20 µg/ µL revelou uma contagem de $3,575 \times 10^6$ conídios viáveis/ mL.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a segurança do produto comercial à base do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em relação a abelha sem ferrão *S. postica*, considerando diferentes concentrações administradas por via tópica e oral. O objetivo foi compreender os efeitos do produto sobre a mortalidade dessas abelhas em um cenário que refletisse a aplicação prática em campo.

Durante esta investigação, foi observado que as taxas de mortalidade foram baixas em concentrações menores e até 6,65 vezes superior à concentração

de campo. Quando comparado aos dados da literatura, o estudo mais recente de Fanta; Pereira; Poltronieri (2023), demonstrou que o mesmo bioinseticida apresentou a presença de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹ na concentração de campo. Essa concentração administrada por via tópica e oral de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL foi letal para *S. depilis* (Leite *et al.*, 2022).

Essa relação de maior tolerância do gênero *Scaptotrigona* pode ser observada no caso da determinação da Dose Letal Média, quando comparado ao estudo de Conceição *et al.* (2014), os testes para determinação da DL₅₀ de *B. bassiana* em abelhas “uruçu-nordestina” (*Melipona scutellaris*), observou-se uma mortalidade significativa mesmo em dosagens mais baixas, e estimou-se que a DL₅₀ de *B. bassiana* para a *M. scutellaris* é de $2,04 \times 10^5$ conídios/mL, comparado a nossa DL₅₀ de 2,3900 µg i.a/abelha, que convertida seria de $4,1841 \times 10^{13}$ conídios/mL.

A germinação e infecção bem sucedida de fungos entomopatogênicos depende de alguns fatores, como um ambiente em que há alta umidade e baixa radiação UV, o estágio e susceptibilidade do hospedeiro, podendo começar nas primeiras 10 a 20 horas (Zimmermann, 2007; Nakai; Lacey, 2017). Em nosso experimento, as condições controladas de umidade e temperatura, além da privação de raios UV, que se assemelha ao ambiente dentro da colmeia, pode ter acarretado no ambiente favorável para a dose de 20 µg/µL ter acometido todas as abelhas expostas topicamente nas primeiras 24 horas. Quando expostas a temperaturas mais elevadas, as colmeias de *A. mellifera* inibem o crescimento fúngico (Peng *et al.*, 2020), de forrageiras que tiveram contato com o fungo e adentraram a colônia.

Sobre os dados de exposição oral de *B. bassiana*, tomando por base a CL₅₀ estimada de 2,9736 µg/µL encontrada em nosso estudo, quando convertida ao volume de 29,736 conídios/mL, mostra-se abaixo do testado por Leite *et al.* (2022), onde a concentração de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL causou mortalidade em *A. mellifera* e *Bombus terrestris* entre 72 e 96 horas em menos da metade da população testada. Esses dados se assemelham com o estudo de Ramanaidu *et al.* (2012), em que a ingestão não trouxe mortalidade significativa para *Bombus impatiens*.

Em relação ao tempo de exposição a *B. bassiana*, um tempo maior de exposição torna-se um recurso interessante para testes, pois nossos estudos testaram a mortalidade dentro de cinco dias de exposição, e na literatura esse dado é bastante diverso. Entre quatro a cinco dias após exposição a 10^7 conídios/mL, a mortalidade foi acima de 50% para *S. depilis* (Leite *et al.*, 2022), seis dias para *Meliponula*

ferruginea a uma concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL (Omuse *et al.*, 2022) e 10 dias para *Melipona scutellaris* (Conceição *et al.*, 2014). Em 20 dias de bioensaio, *B. bassiana* causou 30% de mortalidade em três espécies de abelhas sem ferrão (Toledo-Hernández *et al.*, 2016). Considerando que em uma realidade de campo, o controle de pragas utilizando *B. bassiana* ocorre dentro de 10 a 14 dias.

A abelha *Apis mellifera* foi cogitada como potencial disseminador de *B. bassiana* para controle de pragas em cultura de estufa (Al-Mazra'awi *et al.*, 2007) e até para o controle de pragas dentro das colmeias, como o ácaro *Varroa destructor* (Sinia; Guzman-Novoa, 2018). Kapongo *et al.*, (2007) utilizou *Bombus impatiens* numa concentração de $6,24 \times 10^{10}$ conídios/mL e obteve a mortalidade das pragas. Mas este meio de controle de pragas no Brasil não é uma alternativa viável, sendo um país de agricultura em campo aberto, traz uma dinâmica diferente de outros países de clima temperado, onde a aplicação dos produtos é realizada em casas de vegetação (Parra, 2021).

As formulações a base de organismos entomopatogênicos precisam coexistir com outros meios de controle de pragas, para haver uma funcionalidade agrícola que permitam a fácil aplicação, boa volatilidade e preservação da viabilidade dos microrganismos (Faita; Pereira; Poltronieri, 2023). Desafios como a orientação voltada para os agricultores, que muitas vezes esperam que o controle biológico faça grande parte do trabalho no combate às pragas e/ou doenças na cultura, tecnologias de liberação, qualidade do inimigo natural, logística e disponibilidade destes bioinsumos, seletividade e o manejo quando há resistência, devem ser superados (Parra, 2014), e um melhor planejamento em oferecer o manejo integrado de polinizadores, circulando concomitantemente com o manejo integrado de pragas, assim como maiores estudos associados ao provável risco do uso de microorganismos e impactos nos organismos não-alvo.

Meios de avaliação de risco para organismos vivos usados em controle de pragas são necessários para que, uma vez que cada um tem seu metabolismo, mecanismo de ação, o alvo destinado para controle, e até então não há um teste padrão como é o caso das Diretrizes para Avaliação de Risco de Agrotóxicos pela OCDE, por isso o planejamento de diretrizes para a homologação do protocolo de Manejo Integrado de Pragas e Polinizadores (Egan *et al.*, 2020; Cappa; Barrachi; Cervo, 2022) seria ideal.

7 CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho envolvendo a espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* e o fungo *Beauveria bassiana*. Nas condições experimentais deste estudo, a DL50 E CL50 de *B. bassiana* a partir de um produto comercial demonstra ser maior que o recomendado em bula, confirmando a hipótese nula de que o fungo presente na dose de campo não causa mortalidade das abelhas testadas.

O inseticida dimetoato, recomendado pelo protocolo internacional da OCDE utilizado em bioensaios de toxicidade para a abelha *A. mellifera* se confirmou como controle positivo para a abelha *S. postica* em nosso estudo.

A viabilidade dos conídios presentes no lote utilizado neste trabalho estava dentro do que é preconizado na bula do fabricante.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MAZRA'AWI, M. S. *et al.* Dissemination of *Beauveria bassiana* by Honey Bees (Hymenoptera: apidae) for control of tarnished plant bug (hemiptera. **Environmental Entomology**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 1569-1577, 2006.
- ANTUNES, B. C; RIBEIRO, L. G; ROQUE, A. M; FERREIRA, K. M; WINKALER, E. U, LHANO, M. G. O herbicida Glifosato pode interferir nas interações sociais de abelhas operárias *Apis mellifera*? **Research, Society and Development**. [S.L.] v. 12, n. 6, e29412642439. 2023.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, [S.L.], v. 140, p. 104095, 2020.
- BORLAUG, N. E. The green revolution revisited and the road ahead. 30 year anniversary lecture by a Nobel Peace Prize Laureate. 2000.
- BPBES; REBIPP. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. WOLOWSKI, M; AGOSTINI, K; RECH, A. R; VARASSIN, I. G; MAUÉS, M; FREITAS, L; CARNEIRO, L. T; BUENO, R. O; CONSOLARO, H; CAVALHEIRO, L; SARAIVA, A. M; DA SILVA, C. I; PADGURSCHI, M. C. G. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas. ISBN: 978-85-60064-83-0. 2019.
- BRASIL. **PORTARIA CONJUNTA SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA Nº 1, DE 10 DE ABRIL DE 2023**. Brasília, 04 maio 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674>. Acesso em: 29 maio 2023.
- BRASIL. **Lei nº 14.119**, de 14 de janeiro de 2021. Institui a Política Nacional de Pagamento por Serviços Ambientais. *Diário Oficial da União*, Brasília/DF, 14 jan. 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/lei-n-14.119-de-13-de-janeiro-de-2021-298899394>. Acesso em: 19 jul. 2023.
- CAPPA, F. *et al.* Natural biocide disrupts nestmate recognition in honeybees. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- CAPPA, F; BARACCHI, D; CERVO, R. Biopesticides and insect pollinators: detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 837, p. 155714, 2022.
- CHAM, K. de O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. de P.; FERRO, A. A; VIANA SILVA, F. E. de C.; BORGES, L. de O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T.C. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília: Ibama/Diqua, 2017. 105 p.
- CONCEIÇÃO, P. de J. *et al.* Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 to *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. **Sociobiology**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, (UFRB), 61(2): 184-188, 2014.

CORDEIRO, G. M; DEMÉTRIO, C. G., 2013. Modelos lineares generalizados e extensões. 400 p.

COSTA, L. **Guia fotográfico de identificação de abelhas sem ferrão, para resgate em áreas de supressão florestal**. Belém: Instituto Tecnológico Vale, 2019. 99 páginas. ISBN: 978-85-94365-05-7.

COSTANZA, R. *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 1997.

DOMENICO, C. R di; GIACOMET, C; MASCARENHAS, M. AGROTÓXICOS E ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica Perspectiva Ciência e Saúde**, Osório/RS, v. 7, n. 2, p. 165-182, 2022.

DORIGO, A. S. *et al.* In vitro larval rearing protocol for stingless bees species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, 2019.

EGAN, P. A. *et al.* Delivering Integrated Pest and Pollinator Management (IPPM). **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 6, 2020

ESQUIVEL, I. L.; COULSON, R. N.; BREWER, M. J. A Native Bee, *Melissodes tepaneca* (Hymenoptera: Apidae), Benefits Cotton Production. **Insects 2020, Vol. 11, Page 487**, v. 11, n. 8, p. 487, 2020.

FAITA, M. R.; PEREIRA, E; POLTRONIERI, A. S., 2023. Effect of entomopathogenic fungus-formulated bioinsecticides on stingless bees (Hymenoptera: apidae. **Journal Of Apicultural Research**, p. 1-8, 7.

FERENC, S. A.; FORAN, J. A. (ed.). **Multiple stressors in ecological risk and impact assessment: approaches to risk estimation**. Pensacola, Florida: Setac, 2000. 264 p.

FRAZIER, M. *et al.* What have pesticides got to do with it? **American Bee Journal**, v. 148, n. 6, p. 521–523, 2008.

FREITAS, B. M; NUNES-SILVA, P. Polinização agrícola e sua importância no Brasil. In: Polinizadores no Brasil. Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. **Editora da Universidade de São Paulo**, São Paulo: p. 488. 2012.

FONTES, E. M. G. *et al.* Estratégias de uso e histórico: estratégias de uso. In: FONTES, Eliana Maria Gouveia *et al* (ed.). **Controle Biológico de Pragas na Agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 1-510.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (FAO) **Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use**. p. 1-82. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (FAO) **The pollination of cultivated plants: a compedium for practitioners**. p. 1-324. 2018.

GOUGH, H J; MCINDOE, E C; LEWIS, G B. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. **Journal of Apicultural Research**, v. 33, n. 2, p. 119-125, jan. 1994.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual review of entomology**, v. 44, p. 183–206, 1999.

HIPÓLITO, J; SOUSA, B. S. B; BORGES, R. C; BRITO, R. M. de; JAFFÉ, R.; DIAS, S; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L; GIANNINI, T. C. Valuing nature's contribution to people: the pollination services provided by two protected areas in Brazil. **Global Ecology And Conservation**, v. 20, n. 782, p. 1-11, 2019.

HILJE, L.; MORALES, F. J. Whitefly bioecology and management in Latin America, p. 4250-4260. In: Capinera, J. (ed). **Encyclopedia of Entomology**. Springer, 2580 p, 2008.

IBAMA. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), 2018. (ISBN: 978-85-7300-386-4).

Informação Pessoal; MALASPINA, O. **Fala proferida durante defesa de dissertação**. 28, ago. 2023.

Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S. G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca e H. T. Ngo (eds.), 2016.

KAPONGO, J. P *et al.* Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. **Biocontrol**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 797-812, 2007.

KERR, W. E. NASCIMENTO, G. A. *et al* **Abelha Uruçu**: biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú. 1996.

KLEIN, A.-M; FREITAS, B. M. *et al.* A Polinização Agrícola por Insetos no Brasil: Um guia para fazendeiros, agricultores, extensionistas, políticos e conservacionistas. **Albert-Ludwigs University Freiburg, Nature Conservation and Landscape Ecology**. p. 162, 2020.

KOGAN, M. INTEGRATED PEST MANAGEMENT: Historical Perspectives and Contemporary Developments. **Annual Reviews Entomology**. v. 43: p. 243-270.

KOPPERT. **Bula Boveril WP PL63**. Disponível em: https://www.koppert.com.br/content/brasil/produtos/Boveril_WP_PL63/Bula_Boveril_WP_PL63.pdf. Acesso em: 27 abr. 2023.

LEITE, M. O. G. *et al.*, 2022. Laboratory Risk Assessment of Three Entomopathogenic Fungi Used for Pest Control toward Social Bee Pollinators. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1800.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação na defesa da vida**. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços A Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

MENEZES, C. *et al.* The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. **Pot-Honey**, New York: Springer, p. 153-171, 2013.

MENEZES, C. *et al.* A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851–2855, 2015.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. (MEA) Ecosystems and human well-being: Synthesis. Washington, DC: Island Press, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ministério publica novas especificações para registro de defensivos biológicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-publica-novas-especificacoes-para-registro-de-defensivos-biologicos>. Acesso em: 01 maio 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Procedimentos para o registro de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. Brasília, 25 de maio 2011. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/IN_Conjunta_SDA.SDC.ANVISA.IBAMA_n_1_de_24_de_mai_de_2011.versao_final.pdf. Acesso em: 29 mai. 2023.

NAKAI, M.; LACEY, L. A. (ed) Microbial Control of Insect Pests of Tea and Coffee. **Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice**, Elsevier, p. 223–235, 2017.

NATH, R; SINGH, H; MUKHERJEE, S. Insect pollinators decline: an emerging concern of anthropocene epoch. **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 23-38, 2022.

NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O; ROAT, T. C. **Protocolo para Testes de Toxicidade de substâncias químicas em abelhas sem ferrão: teste de toxicidade aguda por contato**. 2018.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. **Honeybees, Acute Contact Toxicity Test**, n.214, 7p. 1998 A.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. **Honeybees, Acute Oral Toxicity Test**, n.213, 8p. 1998 B.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 4, 2022. Test Guideline n. 425: **Acute oral toxicity: Up and down procedure**. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>

OMUSE, E. R.; NIASSY, S; KIATOKO, N; LATTORFF, H. M. G.; WAGACHA, J. M; DUBOIS, T. A fungal-based pesticide does not harm pollination service provided by the African stingless bee *Meliponula ferruginea* on cucumber (*Cucumis sativus*). **Apidologie**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 1-16, 2022.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.

PARRA, J. R. P. Conceitos e evolução do controle biológico. In: José Roberto Postali Parra (ed.). **Controle Biológico com parasitoides e predadores na agricultura brasileira**. Piracicaba: Fealq, 2021. p. 1-592.

PALUDO, C. R. *et al.* Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

PASCHOAL, A. D. Manejo Integrado de Pragas. In: PASCHOAL, Adilson Dias. **Pragas, agrotóxicos e a crise ambiente**. São Paulo: Expressão Popular, 2019. p. 1-181.

PENG, G. *et al.* Colony heating protects honey bee populations from a risk of contact with wide-spectrum *Beauveria bassiana* insecticides applied in the field. **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2627–2634, 2020.

PICANÇO, M. C. **MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 147 p.

PIRES, C. S. S. *et al.* Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.

POLÍCIA RODOVIÁRIA FEDERAL. **Ibama, Mapa e PRF participam de operação conjunta de fiscalização de agrotóxicos biológicos e químicos ilegais**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/prf/pt-br/noticias/estaduais/sao-paulo/ibama-mapa-e-prf-participam-de-operacao-conjunta-de-fiscalizacao-de-agrotoxicos-biologicos-e-quimicos-ilegais>. Acesso em: 03 out. 2023.

RAMANAIDU, Krilen *et al.* Different toxic and hormetic responses of *Bombus impatiens* to *Beauveria bassiana*, *Bacillus subtilis* and spirotetramat. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 69, n. 8, p. 949-954, 2012.

ROUBIK, D. W. (DAVID W.; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. 2018.

SANTOS, T. DA C. A. DOS; CRUZ-LANDIM, C. DA. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 3, p. 703–714, 2002.

SINIA, A; GUZMAN-NOVOA, E. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* GHA and *Metarhizium anisopliae* UAMH 9198 alone or in combination with thymol for the control of *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 308-316, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2018.1430983>.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, R. A. *et al.* Effect of Three Entomopathogenic Fungi on Three Species of Stingless Bees (Hymenoptera: apidae) under laboratory conditions. **Journal Of Economic Entomology**, [S.L.], v. 109, n. 3, p. 1015-1019, 2016.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, Flavio (eds.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 912 p.

VAISSIÈRE, B.; FREITAS, B.; GEMMILL-HERREN, B. Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use. **FAO**, p. 70, 2011.

VAN LENTEREN, J. C.; WOETS, J. Biological and Integrated Pest control in Greenhouses. **Annual Review of Entomology**, v. 33, n. 1, p. 239–269, 1988.

VASQUES, A. G E. B. C.; COSTA, K. M; LEITE, A. V. A importância da polinização biótica em cultivos agrícolas no Brasil. **Diversitas Journal**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 0083-0102, 2023.

WISE, K. **PREPARING SPREAD PLATES PROTOCOLS**. Minnesota State University-Moorhead: American Society For Microbiology, 2006.

WHITEHORN, P. R; O'CONNOR, S; WACKERS, F. L; GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, p. 351-352. 2012.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 17, p. 553-596. 2007.