



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e
Bacillus amyloliquefaciens sobre imaturos de abelhas sem ferrão**

Luana Katheryne de Souza Dantas

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
MAIO/2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e
Bacillus amyloliquefaciens sobre imaturos de abelhas sem ferrão**

Luana Katheryne de Souza Dantas

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rose Gomes Monnerat
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Silvia Soares Pires

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM AGRONOMIA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e
Bacillus amyloliquefaciens sobre imaturos de abelhas sem ferrão**

LUANA KATHERYNE DE SOUZA DANTAS

**EXAME DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

APROVADA POR:

**Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes, Dra. (Orientadora) / Universidade de Brasília /
rosemonnerat@gmail.com**

**José Ricardo Peixoto, Dra. (Membro interno) / Universidade de Brasília /
peixoto@unb.br**

**Maria Augusta Lima Siqueira, Dra. (Membro externo) / Universidade Federal de
Viçosa/maugusta@ufv.br**

**Annelise de Souza Rosa-Fontana, Dra. (Membro externo) / Universidade Complutense
de Madri /annesouzar@gmail.com**

BRASÍLIA/DF, 27 de MAIO de 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Dantas, Luana Katheryne de Souza
Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Bacillus amyloliquefaciens*
sobre imaturos de abelhas sem ferrão/ Luana Katheryne, orientação de Rose Monnerat. –
Brasília, 2025.

97p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária, 2025.

Bacillus. 2. Biopesticida. 3. Biossegurança. 4. Abelhas nativas.
I. Monnerat, R. II. Título.

Agris / FAO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

DANTAS, L. K de S. Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Bacillus amyloliquefaciens*
sobre imaturos de abelhas sem ferrão. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 97p. Dissertação do Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: LUANA KATHERYNE DE SOUZA DANTAS.

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Bacillus amyloliquefaciens* sobre imaturos de abelhas sem ferrão.

GRAU: MESTRE.

ANO: 2025.

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta
dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O
autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta
dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações
são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Luana Katheryne de Souza Dantas

CPF: 000.163.611-13

Email: luana.embrapa@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus (Yahweh), o Senhor Jesus (Yeshua), ao Espírito Santo (Ruach Yahweh)! “Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.” Romanos 11:36. Amen. “O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo a prudência.” Provérbios 9:10. “Porquanto a sabedoria deste mundo é loucura aos olhos de Deus. Pois está escrito: “Ele apanha os sábios nas próprias artimanhas deles” 1 Coríntios 3:19. “Assim diz Yahweh: “Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem o forte no seu poder, nem o rico nas suas riquezas. Mas quem se gloriar, glorie-se nisto: em conhecer-me e compreender-me, pois Eu Sou Yahweh, o SENHOR, e ajo com lealdade, com justiça e com retidão sobre a terra, porquanto são essas as virtudes nas quais tenho grande prazer!” Assevera o Eterno.” Jeremias 9:23-24.

Agradeço à minha família, meu bem mais precioso, aos meus pais: Amadeus Dantas (in memoriam) e a Verinha Dantas pelo amor, gens, por todos sacrifícios feitos por mim, pelos ensinamentos, cumplicidade e zelo. Aos meus irmãos: Julie Chrystina e Pedro Henrique pelo amor, e até os desentendimentos, as críticas construtivas, as alegrias que tanto nos uni e nos fazem crescer juntos. Aos meus sobrinhos amados: Lucas Eduardo e Igor Daniel pelo amor, respeito e por sempre acrescentarem à minha vida. E ao meu cunhado Célio Lucas pelo zelo.

Ao Dr. Luciano Albernaz por ter me incentivado, há 20 anos, a investir nos meus estudos.

Ao Pastor Martins Machado e Tatiana Novais por todo apoio e zelo para comigo.

Aos meus amigos Tais Milene, Juaci Malaquias, Thayssa Staniski, Daniela Proença, Chang Wilches, Welligton Cavalcante, Jussara Arbues, Rogério Rodrigues, Tamires Duarte e Luana Gilio pelo apoio de sempre e por vibrarem comigo em cada conquista.

À minha orientadora Rose Monnerat, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de trabalhar não apenas com microrganismos, mas também de ampliar meus conhecimentos no fascinante mundo das abelhas. Admiro sua força, disciplina e coragem diante dos desafios, e agradeço por me ensinar que, quando fazemos o que amamos, não é trabalho, é prazer. À minha coorientadora Carmen Pires, por todas as oportunidades, ensinamentos e contribuições fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Levo comigo lições para a vida.

Aos Drs. Cristiano Menezes, Jenifer Ramos, Wagner Bettiol, Bárbara Eckstein, Eliane Fontes, Carmen Pires, Marley Tavares, Itamar Melo, Jussara Arbues e Welligton Cavalcante, pela disponibilidade de espaço e apoio. À equipe da Soluscience (Solubio); aos laboratórios das Abelhas, de Microbiologia Agrícola, de Resíduos e Contaminantes, e à Coleção de Culturas de Microrganismos da Embrapa Meio Ambiente; aos laboratórios de Bactérias Entomopatogênicas, Ecologia e Biossegurança e Criação de Insetos da Embrapa Cenargen e LECO/UnB; ao estatístico Juaci Malaquias, à equipe da Editoração da Embrapa Cerrados e a todos os amigos, pela parceria e colaboração.

À FAV/UnB e a todos que acreditaram e caminharam comigo até aqui, meu sincero agradecimento.

RESUMO

Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente usadas na agricultura como biopesticidas e promotores de crescimento vegetal. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - Btk, isolado HD-1 (S-1450) e *Bacillus amyloliquefaciens* - Ba, estirpe (CCT7994) em larvas de duas espécies de abelhas sem ferrão (ASF) do gênero *Scaptotrigona*. Foram realizados bioensaios *in vitro* (alimento larval natural + *Bacillus*), com larvas de 1 a 3 dias de *S. aff. depilis* expostas a diferentes concentrações de Btk e de Ba, e de *S. cf. postica* expostas a diferentes concentrações de Btk. Como controle negativo foi utilizado apenas alimento larval, como controle absoluto, alimento larval + água destilada e como controle positivo alimento larval e inseticida tiametoxam (Actara®). Análises de Kaplan-Meier revelaram diferenças significativas nas curvas de sobrevivência de *S. aff. depilis* expostas a diferentes concentrações de Btk (Logrank: $X^2= 459,9$; $p < 0,05$) e de Ba (Logrank: $X^2= 551,0$; $p < 0,05$) e *S. cf. postica* exposta a Btk (Logrank: $X^2= 1342,0$; $p < 0,05$). A ingestão de Btk por larvas de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* não afetou significativamente a sobrevivência nas menores concentrações testadas ao longo de 17 dias. Apenas a concentração mais alta testada resultou em redução significativa da sobrevivência das larvas de operárias. Para *S. aff. depilis*, a dieta contendo Btk a 8×10^7 esporos viáveis/mL resultou em mortalidade de 61,7%, enquanto para *S. cf. postica*, a exposição a $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL causou mortalidade de 53,7%. Por outro lado, a exposição a Ba não afetou significativamente a sobrevivência das larvas de *S. aff. depilis* em nenhuma das concentrações testadas. Todos os imaturos de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* expostos ao inseticida tiametoxam morreram com apenas três e dois dias, respectivamente, enquanto no alimento larval puro as taxas de sobrevivência ficaram acima de 90%. A dose de *B. thuringiensis* que causou mortalidade *in vitro* é muito superior àquela factível em campo, portanto, podemos inferir que a mortalidade das larvas de abelhas sem ferrão nas áreas agrícolas tratadas com essa estirpe de Btk será insignificante. Assim, nossos estudos indicam que Ba e Btk nas concentrações utilizadas em campo para controle biológico de pragas são seguras para as larvas das duas espécies de ASF.

Palavras-chave: Abelhas nativas, *Bacillus*, biopesticida, biossegurança, *Scaptotrigona*.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus* are widely used in agriculture as biopesticides and plant growth promoters. This study aimed to assess the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), HD-1 isolate (S-1450), and *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba), strain CCT7994, on larvae of two species of stingless bees (*Scaptotrigona* spp.). In vitro bioassays (natural larval food + *Bacillus*) were conducted using 1 to 3 day old larvae of *S. aff. depilis* exposed to different concentrations of Btk and Ba, and *S. cf. postica* exposed to different concentrations of Btk. The negative control consisted of pure larval food, the absolute control of larval food supplemented with distilled water, and the positive control of larval food with the insecticide thiamethoxam (Actara®). Kaplan–Meier analyses revealed significant differences in the survival curves of *S. aff. depilis* larvae exposed to various concentrations of Btk (Log-rank: $X^2 = 459.9$; $p < 0.05$) and Ba (Log-rank: $X^2 = 551.0$; $p < 0.05$), as well as *S. cf. postica* exposed to Btk (Log-rank: $X^2 = 1342.0$; $p < 0.05$). Ingestion of Btk by *S. aff. depilis* and *S. cf. postica* larvae did not significantly affect survival at the lower concentrations tested over a 17 day period. Only the highest concentration tested led to a significant reduction in worker larval survival. For *S. aff. depilis*, a diet containing Btk at 8×10^7 viable spores/mL resulted in 61.7% mortality, while exposure of *S. cf. postica* to 9.4×10^8 viable spores/mL caused 53.7% mortality. In contrast, exposure to Ba did not significantly affect larval survival of *S. aff. depilis* at any concentration tested. All immature individuals of *S. aff. depilis* and *S. cf. postica* exposed to the insecticide thiamethoxam died within just three and two days, respectively, whereas in the pure larval food control, survival rates remained above 90%. The dose of *B. thuringiensis* that caused in vitro mortality is much higher than what is realistically encountered, allowing us to infer that larval mortality of stingless bees in agricultural areas treated with this Btk strain is negligible. Thus, our findings indicate that Ba and Btk, at concentrations used in the field for biological pest control, are safe for larvae of the two evaluated stingless bee species.

Key Word: Native bees, *Bacillus*, biopesticide, biosafety, *Scaptotrigona*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da sequência de atividades no bioensaio conduzido para verificação da bioatividade de *Bacillus* spp. sobre lagartas de *S. frugiperda* após a incorporação no alimento larval de *Scaptotrigona* spp. 35
- Figura 2:** Crescimento de colônias fúngicas em ensaio duplo, conforme proposto por Montalvão. As escalas de A0 a A5 representam o crescimento fúngico sem interferência do antagonista, enquanto as escalas de B0 a B5 representam o crescimento com interferência do antagonista 37
- Figura 3:** Microplacas de acrílico de 96 poços em fundo “U” (86 x 128mm) com cavidades (7mm de diâmetro e 10 mm de profundidade) utilizadas como células de cria artificiais para as larvas das abelhas sem ferrão com corte das pontas laterais acondicionadas em placa de petri com ventilação modelo Corning 750. 40
- Figura 4:** Em destaque a estrutura espiráculo (órgãos de respiração). Órgãos de respiração da larva de abelha sem ferrão. Foto: Daniel Daldegan 41
- Figura 5:** Mortalidade média (%) de *Spodoptera frugiperda* (\pm erro padrão) submetidas à dieta artificial pura (CN - controle negativo); dieta com água (CA - controle absoluto); dieta com alimento larval de *S. aff. depilis* (CAL - controle com alimento larval); dieta com alimento larval + Btk (Al+Btk - 8×10^8 esporos viáveis/mL); dieta com suspensão de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - Btk (8×10^8 esporos viáveis/mL). As avaliações de mortalidade foram realizadas sete dias após a montagem dos bioensaios. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de Tukey)..... 44
- Figura 6:** Mortalidade média (%) de *Spodoptera frugiperda* (\pm erro padrão) submetidas à dieta artificial pura (CN - controle negativo); dieta com água (CA - controle absoluto); dieta com alimento larval de *S. aff. depilis* (CAL - controle com alimento larval; dieta com suspensão de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - Btk (Btk - $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL); dieta com alimento larval + Btk (Al+Btk - $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL). As avaliações foram realizadas em sete dias após a montagem dos bioensaios. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de Tukey). 45

Figura 7: Bioensaio de confronto direto entre o antagonista *Bacillus amyloliquefaciens*, na concentração de 2×10^8 esporos viáveis/mL, contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. (A) Leitura com 48 horas: efeito biocontrolador sobre o fungo. (B) Controle negativo: crescimento fúngico sem interferência do antagonista (leitura com 48 horas). (C) Leitura com 168 horas: efeito antagonista com redução do crescimento micelial (escala B3). (D) Controle negativo (168 horas): crescimento fúngico completo sem interferência do antagonista. (E) Bioensaio em triplicata46

Figura 8. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L^{-1} , *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) nas concentrações de 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 e 8×10^7 esporos viáveis/mL48

Figura 9. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* cf. *postica* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L^{-1} , *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) nas concentrações de $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL.....51

Figura 10. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L^{-1} , *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) nas concentrações de 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL 56

Figura 11. Tempo médio (em dias) do ciclo de vida de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona* cf. *postica* expostas a diferentes concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), avaliadas diariamente até a fase de empupamento (até 17º dia). Os tratamentos testados foram: CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. cf. postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo:

Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹) e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL. As colunas representam as médias acompanhadas do erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos, pelo teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (g.l. = 5; $p > 0,05$)..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da análise das curvas de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e das comparações pareadas entre os tratamentos avaliados quanto aos possíveis efeitos da cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre imaturos de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. Os tratamentos consistiram em: CN (controle negativo – alimento larval puro), CA (controle absoluto – alimento larval com adição de água destilada), CP (controle positivo – tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹) e quatro concentrações do biopesticida à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk): 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 e 8×10^7 esporos viáveis/mL 50

Tabela 2: Resultados da análise da curva de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e teste de comparações pareadas entre cada tratamento dos experimentos para avaliar os possíveis efeitos de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) sobre imaturos de *S. cf. postica*. CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. cf. postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL..... 53

Tabela 3: Taxa de mortalidade de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *Scaptotrigona* cf. *postica* expostas a quatro concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) avaliados diariamente até as larvas empuparem (até o 17º dia). CN (Controle negativo: alimento larval puro de *Scaptotrigona* spp.), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), seguido das concentrações de Btk: 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 , 8×10^7 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis*, e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL para *S. cf. postica*..... 54

Tabela 4: Resultados da análise da curva de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e teste de comparações pareadas entre cada tratamento dos experimentos de possíveis efeitos de cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) sobre imaturo de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL..... 57

Tabela 5: Taxa de mortalidade de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* expostas a quatro concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus amyloliquefaciens*

(Ba) avaliados diariamente até as larvas empuparem (até o 17º dia). CN (Controle negativo: alimento larval puro de *Scaptotrigona* spp.), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), seguido das concentrações de Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis* 58

Tabela 6: Tempo médio (em dias) do ciclo de vida de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona* cf. *postica* expostas a diferentes concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), avaliadas diariamente até a fase de empupamento (até 17º dia). Os tratamentos testados foram: CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. cf. postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL 59

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Símbolo/Sigla	Significado	Unidade
aff.	affinis	
Ba	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
B.O.D.	Demanda Biológica de Oxigênio	
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	
CA	Controle absoluto	
CCD	do inglês “Colony Collapse Disorder”	
CN	Controle negativo	
CP	Controle positivo	
Cry	Proteína cristal	
cf.	Confronte com	
g	Gramas	
°C	Graus celsius	
Há	Hectare	
i.a	Ingrediente ativo	
Kg	Quilograma	
L ⁻¹	Litro	
μl	Microlitros	
mL	mililitro	
mm	Milímetros	
NaCl	Cloreto de sódio	g/mol ²
%	Porcentagem	
spp.	espécies	
UFC	Unidade Formadora de Colônia	
UR	Umidade relativa	
UV	Radiação ultravioleta	
var.	Variedade	

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS	24
2.2. ABELHAS SEM FERRÃO - ORGANISMO MODELO.....	25
2.3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
2.5. AVALIAÇÃO DE RISCO SOBRE ABELHAS.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. HIPÓTESE.....	33
5. MATERIAL E MÉTODO.....	34
5.1. ESPÉCIES DE ABELHA SEM FERRÃO AVALIADAS	34
5.2. VALIDAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> spp. PARA OS ENSAIOS COM ABELHAS	35
5.2.1. BIOATIVIDADE DOS <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> EM <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i>	36
5.2.2. BIOATIVIDADE DOS <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EM FUNGO <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	37

5.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE <i>Bacillus</i> spp. SOBRE IMATUROS DE <i>Scaptotrigona</i> spp.	39
5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
6. RESULTADOS	44
6.1. BIOATIVIDADE DO BIOINSETICIDA DE <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> EM LAGARTAS DE <i>S. frugiperda</i>	44
6.2. BIOATIVIDADE DE BIOPESTICIDA <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CONTRA O FUNGO <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	46
6.3. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE BIOPESTICIDAS À BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> E DE <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EM IMATUROS DE ABELHAS DO GÊNERO <i>Scaptotrigona</i> spp.	48
6.3.1 Sobrevivência e taxa de mortalidade	48
6.3.2 Tempo médio do ciclo de vida	59
7. DISCUSSÃO.	62
7.1 Bioatividade de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em <i>S. frugiperda</i>	62
7.2 Bioatividade de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	62
7.3 Toxicidade de biopesticidas <i>Bacillus</i> spp. em imaturos de <i>Scaptotrigona</i> spp.....	62
7.3.1 Sobrevivência e taxa de mortalidade.....	62
7.3.1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Btk)	64
7.3.1.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ba).....	72
7.3.2 Tempo médio do ciclo de vida.....	75
8. CONCLUSÃO.....	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são polinizadores essenciais em ecossistemas naturais e em plantações agrícolas, desempenhando um papel vital na manutenção da biodiversidade e na produtividade das culturas (Klein et al., 2007; BPBES/REBIPP, 2019). A perda de uma única espécie pode comprometer a reprodução vegetal e a fidelidade floral (Brosi e Briggs, 2013), resultando na redução da biodiversidade (Eeraerts et al., 2022).

Nas últimas décadas, a intensificação da agricultura, impulsionada pelo avanço tecnológico (Albuquerque e da Silva, 2008), levou à conversão de áreas naturais para sistemas de produção agrícola (González-Varo et al., 2013; Vanbergen et al., 2013), resultando em fragmentação e perda de habitat (Viana et al., 2012; Pires et al., 2016; Vasiliev e Greenwood, 2021) que figuram entre os principais impactos negativos, contribuindo significativamente para a redução das populações de abelhas nativas (Imperatriz-Fonseca et al., 2006; IPBES, 2016).

O declínio populacional de abelhas manejadas do gênero *Apis* é amplamente reconhecido e descrito mundialmente como Colony Collapse Disorder (CCD) (vanEngelsdorp et al., 2009; Rucker e Thurman, 2012). No entanto, colônias de abelhas silvestres também têm sido impactadas, resultando em uma redução significativa dessas populações (Pires et al., 2016). Estudos sobre as populações de abelhas sem ferrão, a nível global, indicam que as atividades antrópicas são os principais fatores de ameaça à sobrevivência dessas espécies silvestres (Toledo-Hernández et al., 2022). No Brasil, a perda de colônias de abelhas, tanto de *Apis mellifera*, quanto de abelhas sem ferrão, tem sido registrada em diversas regiões (Castilhos et al., 2019). O uso inadequado e contínuo de agrotóxicos (Nocelli et al., 2012), especialmente o uso indiscriminado de pesticidas sintéticos, destaca-se como uma das principais causas da diminuição das populações de insetos polinizadores (Dudley e Alexander, 2017; Castilhos et al., 2019).

Estudos indicam que os produtos químicos de proteção de plantas (PPPs) apresentam elevada toxicidade para insetos polinizadores, incluindo abelhas do gênero *Apis* e espécies não *Apis* (Köhl et al., 2019), especialmente aqueles pertencentes aos grupos químicos dos neonicotinoides (Bass et al., 2015), organofosforados e piretróides (Palmer et al., 2013). Essa prática tem despertado preocupações quanto à sustentabilidade ambiental (Faita et al., 2021) e aos riscos à saúde humana (Chavana e Joshi 2024) e animal, especialmente pelos efeitos sobre organismos não alvo, como as abelhas (Desneux et al., 2007; Stoffel e Arend, 2010). Somam-se a esses impactos as mudanças climáticas (Giannini et al. 2017, Vasiliev e Greenwood, 2021; Toledo-Hernández et al., 2022), poluição ambiental, doenças (BPBES-REBIPP, 2019) e introdução de patógenos por espécies exóticas e competição por recursos (David et al., 2019; Toledo-Hernández et al., 2022), que juntos intensificam a degradação da fauna e flora nativas agravando a perda de biodiversidade e comprometendo a estabilidade dos ecossistemas (Steffan-Dewenter, 2003; Vasiliev e Greenwood, 2021). Esses fatores representam uma ameaça significativa aos polinizadores e aos serviços ecossistêmicos que desempenham (Memmott et al., 2007; Arena e Sgolastra, 2014; David et al., 2019; Toledo-Hernández et al., 2022). Dessa forma, é fundamental proteger as abelhas, especialmente diante do declínio contínuo das populações de insetos registrado nas últimas décadas (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2016; Sánchez-Bayo, 2019).

Esse cenário tem estimulado a busca por alternativas mais sustentáveis no manejo agrícola (Thakore, 2006; Kumar e Kumar, 2019). Alternativas viáveis, como o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que combina métodos culturais, resistência de plantas e controle biológico, reduzindo a necessidade de pesticidas químicos (van Lenteren et al., 2018; Köhl et al., 2019) tem sido amplamente adotado na agricultura comercial (Quarles, 2013), bem como o Manejo Integrado de Pragas e Polinizadores (MIPP) (Chavana e Joshi, 2024). Nesse cenário, o

controle biológico, baseado no uso de organismos antagônicos, tem se consolidado como uma abordagem eficaz para o manejo de pragas e doenças, promovendo maior sustentabilidade na agricultura (Köhl et al., 2019).

Entre as abordagens do controle biológico, o uso de biopesticidas microbianos tem ganhado destaque (Quarles, 2013; Mahmood et al., 2016; van Lenteren et al., 2018; Köhl et al., 2019), especialmente aqueles formulados com microrganismos ou seus metabólitos (Bakker et al., 2002; van Lenteren et al., 2018). Os biopesticidas são derivados de organismos vivos, como bactérias, fungos e vírus (Quarles, 2013), e ou de produtos naturais, como óleos essenciais (Chavana e Joshi, 2024). As formulações de biopesticidas, de modo geral, seguem os mesmos padrões das utilizadas para pesticidas sintéticos, podendo ser apresentadas em formas secas, como pós, pó molhável e grânulos/microgrânulos, ou líquidas, como emulsões e suspensões concentradas (Gašić e Tanović, 2013; Butu et. al., 2022).

Esses produtos são amplamente utilizados na agricultura orgânica (van Lenteren et al., 2018) devido à sua alta especificidade (Mishra et al., 2020), menor risco de seleção de populações resistentes e menor persistência no ambiente (Pereira et al., 2016) e menor toxicidade, sendo inócuos à saúde humana (van Lenteren et al., 2018; Kumar et al., 2021), ao meio ambiente, e a organismos benéficos (Kumar et al., 2021). O avanço da agricultura regenerativa, fundamentada em práticas sustentáveis, tem sido impulsionado pelo uso de biopesticidas e outros bioinsumos (Mazaro et al., 2022). Esses produtos biotecnológicos representam uma solução ecológica e sustentável aos pesticidas químicos em agroecossistemas (Glare et al., 2012; Prabha et al., 2016; Samada e Tambunan, 2020) reduzindo a dependência de agroquímicos permitindo a redução do uso de inseticidas sintéticos (Quarles, 2013) e contribuindo para a conservação da biodiversidade (Köhl et al., 2019; Wang et al., 2022). Um

exemplo disso é a cultura da soja no Brasil, onde essa abordagem resultou em uma diminuição de 50% no consumo desses produtos (Samada e Tambunan, 2020).

Dentre os biopesticidas disponíveis comercialmente, os microbianos se destacam por sua eficácia no controle de pragas e patógenos, sendo classificados em três categorias: microbianos, bioquímicos e proteínas inseticidas expressas por plantas (PIPs, Plant-Incorporated Protectants) (Chavana e Joshi, 2024). Dentro da categoria microbiana, destacam-se os produtos à base de bactérias, fungos e vírus, sendo que bactérias e fungos são predominantemente produzidos por processos fermentativos (Capalbo et al., 2001; Pereira et al., 2016; Kumar et al., 2021).

Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente utilizadas no biocontrole de fitopatógenos e insetos-praga (Libardoni et al., 2021), além de atuarem como promotoras de crescimento vegetal (Araujo Avila et al., 2021). Os produtos à base de microrganismos têm substituído os químicos e, embora amplamente promovidos como alternativas seguras e sustentáveis, sua eficácia e necessidade devem ser criteriosamente avaliadas antes da aplicação na agricultura (Matyjaszczyk, 2018) e em florestas (Sanchis e Bourguet, 2008; Lacey et al., 2015), seguindo um calendário de aplicação (Matyjaszczyk, 2018). As formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) e *aizawai* (Bta) são os bioinseticidas mais utilizados contra larvas de lepidópteros, sendo aplicados tanto na agricultura orgânica quanto na convencional (Bravo et al., 2011). Esses bioinseticidas são eficazes no controle de lagartas desfolhadoras em diversas culturas, como tomate, algodão, frutas cítricas, mandioca, soja, trigo e milho (Angelo et al., 2010; Bravo et al., 2011; Simonato et al., 2014; Barbosa et al., 2021). Por sua vez, *Bacillus amyloliquefaciens* desempenha um papel fundamental no biocontrole de fitopatógenos, especialmente fungos (Abreu et al., 2022; Wang et al., 2022), devido à produção de compostos

antimicrobianos e à capacidade de estimular o crescimento vegetal. Sua aplicação representa uma alternativa sustentável para o manejo de doenças pós-colheita (Wang et al., 2022).

No Brasil, esses microrganismos têm sido produzidos comercialmente há décadas e, mais recentemente, pelos próprios agricultores, em um sistema de produção conhecido como “*on farm*”¹ (Araujo Avila et al., 2021). Segundo dados da CropLife Brasil (2024), o mercado de bioinsumos cresceu 15% na safra 2023/2024, atingindo vendas no valor de 5 bilhões de reais. No Brasil houve um crescimento do mercado 4 vezes maior que o do resto do mundo e a estimativa de crescimento global até 2032 estará numa taxa de 13 a 14%, correspondendo a 45 bilhões de dólares (US\$ 23,08 bilhões até o final de 2030).

A pesquisa sobre biopesticidas tem se concentrado na identificação de isolados mais eficazes e no aprimoramento de formulações e tecnologias de fabricação, visando segurança para a saúde humana (Cappa et al., 2022), maior eficiência e menor impacto ambiental. Embora sejam considerados de baixo risco para polinizadores (Chavana e Joshi, 2024), a crescente aplicação desses biopesticidas em culturas visitadas por abelhas torna necessário avaliar a seus possíveis efeitos adversos (Libardoni et al., 2021). No entanto, ainda há pouca atenção voltada para a real segurança desses produtos em polinizadores silvestres e manejados (Cappa et al., 2022). Apesar de serem uma alternativa promissora aos pesticidas sintéticos, seu uso exige análises detalhadas para evitar impactos subletais em organismos não-alvo, como os polinizadores (Chavana e Joshi, 2024). A avaliação de risco de pesticidas em nível global baseia-se na determinação da toxicidade aguda e crônica dessas substâncias para artrópodes

¹ “*on-farm*” refere-se à produção direta de insumos agrícolas na propriedade, como produtos fitossanitários, e agentes biológicos de controle. No Brasil, a legislação, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regula a multiplicação de microrganismos, isentando produtos fitossanitários para uso próprio na agricultura orgânica. Contudo, a produção “*on farm*” de bioinsumos carece de regulamentação específica no país (MAPA, 2021; CropLife Brasil, 2023).

benéficos, incluindo abelhas (Sabo et al., 2020). Cada produto fitofarmacêutico passa por essa avaliação antes de sua autorização (Krahner et al., 2022).

No entanto, ainda há lacunas na avaliação de risco para polinizadores silvestres, essenciais para a polinização (Chavana e Joshi, 2024). Sabo et al. (2020) ressaltam a necessidade de ampliar os estudos sobre os potenciais efeitos subletais de produtos fitossanitários à base de microrganismos.

Chavana e Joshi (2024) destacam que a maioria dos estudos sobre os impactos de pesticidas concentra-se em polinizadores manejados, como *Apis mellifera* e *Bombus* spp., enquanto os efeitos sobre espécies nativas ainda são pouco explorados. Os paradigmas tradicionais de avaliação de risco de pesticidas têm sido baseados em *Apis mellifera*, da tribo Apini, espécie exótica no Brasil, com biologia bem conhecida e ampla distribuição geográfica, razão pela qual é amplamente utilizada como organismo-modelo em protocolos internacionais, como os da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a, b) (Cham et al., 2018; Boyle et al., 2019). Os paradigmas tradicionais de avaliação de risco baseados em abelhas manejadas não contemplam adequadamente as peculiaridades fisiológicas, comportamentais e ecológicas das abelhas sem ferrão, o que reforça a necessidade de abordagens específicas para esses polinizadores. Com os avanços científicos, estudos e métodos envolvendo abelhas sem ferrão vêm sendo progressivamente incorporados às avaliações de risco (Viana-Silva et al., 2018). Entre as abelhas da tribo Meliponini e da tribo Apini, a diferenciação entre castas manifesta-se em diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Weaver, 1966; Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990). As abelhas sem ferrão (ASF) diferem de *A. mellifera* em aspectos biológicos, como o sistema de alimentação larval por aprovisionamento massivo, no qual uma única porção de alimento é fornecida antes do selamento da célula, impedindo o contato posterior com operárias (Michener, 1974; Menezes

et al., 2013). Tais diferenças inviabilizam a aplicação direta dos protocolos padronizados da OECD, desenvolvidos para *A. mellifera*, às ASF.

Para tornar os testes válidos e confiáveis para essas espécies, modificações metodológicas vêm sendo desenvolvidas por um grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Osmar Malaspina (UNESP – Rio Claro) e pela Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar – Araras), com a participação de universidades brasileiras e internacionais, institutos de pesquisa e empresas do setor. Esse grupo é responsável pela padronização de métodos adaptados para ASF, atualmente em fase de consolidação, com vistas à futura submissão à OECD para reconhecimento formal e adoção por órgãos reguladores (Malaspina et al., 2024).

Nesse contexto, foi elaborada uma matriz de seleção que identificou espécies de abelhas nativas candidatas a organismos-modelo para análises toxicológicas, com base em critérios como abundância, facilidade de manejo, ocorrência em culturas agrícolas e potencial de exposição (Pires e Torezani, 2018). Ao todo, foram listadas 20 espécies sociais e 28 solitárias.

Com base em critérios relacionados às culturas agrícolas de importância para o Brasil, cinco espécies sociais e seis solitárias foram selecionadas como prioritárias para análises de risco de agrotóxicos (Alves, 2013; Pedro, 2014). Dentre as espécies listadas na matriz, destaca-se *Scaptotrigona postica*, que, embora não esteja entre as prioritárias, tem sido utilizada por esse mesmo grupo de pesquisa no desenvolvimento e padronização de protocolos adaptados para ASF, sendo indicada como a espécie mais adequada para modelos experimentais com larvas (Malaspina et al., 2024).

A adoção dessas espécies-padrão e a validação de métodos específicos constituem etapas fundamentais, considerando que generalizações baseadas exclusivamente em *A. mellifera* podem subestimar os riscos para ASF (Goulson, 2013; Cham et al., 2018; Lourencetti

et al., 2023; Chavana e Joshi, 2024), cujas sensibilidades aos biopesticidas variam entre espécies (Hopwood et al., 2012).

Nesse sentido, torna-se necessário investigar os potenciais efeitos dessas bactérias em diferentes estágios do desenvolvimento das abelhas sem ferrão, a fim de avaliar o impacto desses agentes biológicos sobre a saúde e sobrevivência destes. Nesse estudo, selecionamos duas espécies de abelhas, *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *Scaptotrigona* cf. *postica*, cepas das bactérias *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e *B. amyloliquefaciens* para averiguar os potenciais riscos que esse grupo de microrganismos oferece às larvas de abelhas sem ferrão. Almeja-se que os resultados desta pesquisa subsidiem estratégias de manejo de pragas mais eficazes e seguras, beneficiando a conservação de abelhas sem ferrão e a sustentabilidade do agronegócio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS

As abelhas são consideradas de extrema importância para a manutenção da vida no planeta (Barbosa et al., 2017), contribuindo para o serviço ecológico da produção de alimentos (Costanza et al., 1997; Pereira et al., 2015; BPBES/REBIPP, 2019), além de desempenharem papel fundamental na preservação dos ecossistemas e no desenvolvimento da flora (Pereira et al., 2015). São reconhecidas como um dos principais agentes polinizadores do mundo (Michener, 2007) e os mais manejados para a agricultura (Imperatriz-Fonseca et al., 2006). Estima-se que sejam responsáveis pela polinização de 40% a 90% (Nocelli et al., 2012) das 240.000 espécies de plantas fanerógamas que existem no planeta (Freitas e Pinheiro, 2010).

As abelhas são os principais polinizadores devido ao seu grande número na natureza e adaptação às estruturas florais complexas (Kevan e Baker, 1983; Proctor et al., 1996). Elas apresentam uma estreita relação com as plantas a partir das quais obtêm recursos alimentares, como pólen e néctar (Williams et al., 1991; Rech et al., 2014), que fornecem energia e proteína (Pereira et al., 2015), bem como recursos para a proteção dos ninhos, como folhas, resinas e sementes.

Aproximadamente 70% das 124 culturas utilizadas pelo homem para consumo são dependentes de insetos polinizadores (Gallai et al., 2009; Bernal et al., 2010; Potts et al., 2010; Klein et al., 2007; 2020). A produção de frutas, vegetais e sementes das 86 culturas mais importantes no cenário mundial, dependem da polinização por animais, enquanto 28 não dependem diretamente de polinizadores (Klein et al., 2007). De acordo com Klein et al. (2020), a ausência desses polinizadores pode levar a uma diminuição de mais de 90% nos rendimentos de algumas frutas e sementes. As abelhas, ao visitarem as flores, promovem a distribuição

uniforme dos grãos de pólen e depositam pólen de outras flores, aumentando a quantidade e qualidade do pólen no estigma, caracterizando a polinização cruzada (Freitas e Pinheiro, 2010).

2.2. ABELHAS SEM FERRÃO - ORGANISMO MODELO

Os meliponíneos, conhecidos como abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) constituem o principal grupo de abelhas sociais (W. Dick, 2001; Michener, 2007; 2013; Rech et al, 2014) e estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Menezes et al., 2013; Michener, 2013), ocorrendo do Rio Grande do Sul até o México. São considerados os polinizadores mais importantes em ecossistemas naturais e agrícolas (W. Dick, 2001; Siregar et al., 2016). Sua organização social complexa evoluiu por meio de etapas distintas, caracterizadas pelo desenvolvimento da cooperação no cuidado com a prole, divisão reprodutiva do trabalho e sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

As colônias de abelhas sem ferrão são compostas por rainha, operárias e machos. A rainha fisogástrica (Michener, 1974) é a única fêmea fértil da colônia e desempenha exclusivamente a função reprodutiva, sendo dependente da colônia para sua sobrevivência e incapaz de fundar um novo ninho sozinha (Laidlaw, 1992; Page e Peng, 2001).

As operárias, por sua vez, são fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis por diversas atividades essenciais, como cuidado com a prole, coleta de alimento, defesa do ninho e manutenção estrutural (Koedam et al., 2001). Em algumas espécies, no entanto, operárias podem realizar posturas de ovos, que podem ser tróficos, ingeridos pela rainha, ou reprodutivos, originando machos (Beig, 1972; Imperatriz-Fonseca e Kleinert, 1998; Koedam et al., 2001).

As espécies da tribo Meliponini apresentam um sistema de provisionamento larval conhecido como provisionamento massivo, no qual as operárias depositam, por regurgitação, uma única porção de alimento líquido nas células de cria (Kerr, 1948; Nogueira-Neto, 1997, Menezes et al., 2013), antes da oviposição pela rainha (Michener et al., 1974; Hartfelder e Engels, 1989). Esse alimento larval é um fluido viscoso composto por aproximadamente 16% de pólen e 8% de mel, além de secreções glandulares produzidas pelas operárias (Kerr e Laidlaw, 1956; Velthuis e Velthuis, 1998). Diferentemente das abelhas do gênero *Apis*, cujas larvas são alimentadas de forma progressiva, as larvas de meliponíneos não recebem alimento adicional após a oviposição, pois as células são imediatamente operculadas pelas operárias, isolando os imaturos do contato com os adultos durante seu desenvolvimento (Michener, 1974; Velthuis, 1997). Entre os meliponíneos, as abelhas do gênero *Scaptotrigona*, como *S. aff. depilis* e *S. cf. postica*, destacam-se por sua ampla distribuição geográfica e alta densidade populacional. Essas espécies nidificam em ocos de árvores e formam colônias perenes e numerosas, com populações variando entre 2.000 e 50.000 indivíduos (Lindauer e Kerr, 1960; Nogueira-Neto, 1970; Grüter, 2020). A rainha pode ovipositar cerca de 300 ovos por dia (Menezes et al., 2013), tornando essas abelhas organismos-modelo promissores para estudos de criação *in vitro*. Além disso, as operárias forrageiras dessas espécies apresentam um alcance de voo de até 903 metros, reforçando sua importância ecológica como polinizadoras de diversas espécies vegetais (Lichtenberg et al., 2010).

No caso de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica*, as larvas de operárias ingerem de forma massal todo o alimento larval disponibilizado, aproximadamente 35 microlitros, ao longo dos seis primeiros dias do ciclo larval (Menezes et al., 2013). A diferenciação de castas nesse grupo é determinada pela quantidade de alimento consumido durante a fase larval (Buschini et al., 1996), um mecanismo distinto do observado em outras abelhas sociais.

2.3. *Bacillus amyloliquefaciens*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias Gram-positivas esporulantes, amplamente distribuídas no ambiente e capazes de formar endósporos dormentes em condições adversas (Gordon et al., 1973; Angelo et al., 2010; Bravo et al., 2011). Podem ser encontradas naturalmente no solo e em outros substratos, como superfícies ou tecidos de plantas (Azevedo et al., 2000; Alves e Lopes, 2008). Dentre as espécies mais conhecidas estão *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. weihenstephanensis*, que possuem diversas aplicações na biotecnologia e na agricultura (Tamez Guerra et al., 2001; Polanczyk e Alves, 2003).

A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* foi isolada do solo pela primeira vez em 1943, pelo cientista japonês Juichiro Fukumoto (Fukumoto, 1943; Priest et al., 1987). Pertencente à família *Bacillaceae* e ao gênero *Bacillus* (Fritze, 2004), é classificada como Gram-positiva, em forma de bastonete (Chen, 2007). Segundo Monnerat et al. (2020), pode ser isolada de diferentes ambientes, como solo e alimentos.

A espécie *B. amyloliquefaciens* é reconhecida por suas propriedades benéficas no contexto agrícola. Este microrganismo é amplamente utilizado devido à sua capacidade de produzir uma vasta gama de enzimas e metabólitos secundários, que desempenham papéis cruciais no biocontrole de fitopatógenos e na promoção do crescimento das plantas (Boottanun et al., 2017), usando diversos mecanismos, incluindo a síntese de ácido indol-3-acético (IAA) (Liu et al., 2016), melhora a eficiência do uso de fósforo pelas plantas (Shao et al., 2015). Além disso, os metabólitos secundários foram amplamente documentados com aplicações na indústria alimentícia (Chang et al., 2015).

2.4. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis Berliner (Bt) se destaca como a principal bactéria utilizada no controle biológico (Alves e Lopes, 2008), devido às suas características biológicas (Angelo et al., 2010). Sua eficácia no manejo de pragas está relacionada à capacidade de produzir toxinas entomopatogênicas com ação inseticida (Gordon et al., 1973; Angelo et al., 2010; Bravo et al., 2011; Kumar et al., 2021), que se distinguem pela alta especificidade (Mishra et al., 2020) e segurança ambiental (Chavana e Joshi, 2024), quando comparadas aos inseticidas químicos D'Urso et al. (2016). Essas características tornam o Bt amplamente utilizado na formulação de bioinseticidas comerciais para o controle de insetos-praga (Andrews et al., 1987). Além disso, as toxinas derivadas de Bt tornam esse microrganismo um grande potencial inovador para o desenvolvimento agrícola sustentável (Kumar et al., 2021).

Descoberto por Ernst Berliner em 1911, na província alemã da Turíngia, *B. thuringiensis* foi inicialmente isolado a partir da lagarta *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como traça-das-farinhas (Milner, 1994; Shelton et al., 2002; Galzer e Azevedo Filho, 2016). Muitas sorovariedades foram isoladas do solo, sendo as mais abundantes as sorovariedades *kurstaki* e *galleriae* (Delucca et al., 1981). Essa espécie compartilha semelhanças morfológicas e genéticas com *B. cereus* e *B. anthracis*, diferenciando-se pela produção de inclusões protéicas cristalinas tóxicas ou produção de corpos paraesporais durante a esporulação, com atividade inseticida, conhecidos como toxinas Cry (Palma et al., 2014; Kumar et al., 2021). A presença desses cristais proteicos intracelulares, descoberta por Hannay em 1953, é a principal característica distintiva da espécie (Glare et al., 2000, Angelo et al., 2010).

B. thuringiensis produz diferentes proteínas inseticidas, cada uma com uma gama específica de ação sobre determinadas ordens de insetos. Em geral, essas toxinas são altamente específicas, agindo apenas sobre Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera, além de nematóides, ácaros e protozoários (Schnepf, 1998; Galzer e Azevedo Filho, 2016). No entanto, estudos recentes sobre a atividade inseticida das proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*, indicaram a semiespecificidade do Bt, algumas proteínas podem apresentar atividade cruzada, atingindo espécies de ordens taxonômicas diferentes (Coyle et al., 2000; van Frankenhuyzen, 2017; Babin et al., 2020; Redmond et al., 2020; Nawrot-Esposito et al., 2020; Tudoran et al., 2021). A atividade cruzada substanciada foi observada em 14 famílias dentro das classes Cry, Cyt e Vip, indicando que algumas proteínas de Bt têm efeitos em ordens fora da sua especificidade primária (Alkassab et al., 2022). A maioria das proteínas tem ação contra Lepidoptera (59), Diptera (42), Coleoptera (40) e Hemiptera (10). Sendo apenas 4 proteínas foram ativas contra Hymenoptera, evidenciando uma especificidade limitada para esta ordem (Alkassab et al., 2022). Esse efeito pode ser benéfico para ampliar o espectro de ação contra pragas, mas também levanta preocupações sobre possíveis impactos negativos em insetos benéficos, como abelhas e outros polinizadores (Redmond et al., 2020).

Essa toxicidade é atribuída à produção das proteínas Cry, também conhecidas como δ -endotoxinas (Fazolin et al., 2007; Bravo et al., 2007), e Cyt, que são sintetizadas durante a fase de esporulação da bactéria (Fazolin et al., 2007; Bravo et al., 2007). Formadoras de cristais únicos ou múltiplos. Após a ingestão, os cristais proteicos são solubilizados no trato digestivo dos insetos-alvo devido ao pH alcalino do intestino (Chestukhina, 1982; Schuler, 1998; Bravo et al., 2007; Galzer e Azevedo Filho, 2016). Os cristais proteicos representam cerca de 25% do peso seco da célula (Agaisse e Lereclus, 1995). As toxinas são ativadas por proteases e se ligam a receptores específicos no epitélio intestinal, desencadeando a formação de poros na membrana

celular. Isso compromete a integridade do tecido e leva à morte das larvas (Fazolin et al., 2007; Galzer e Azevedo Filho, 2016). Após a ativação proteolítica no intestino médio, as toxinas se ligam à receptores específicos presentes nas microvilosidades das células intestinais, alterando a permeabilidade da membrana, causando inchaço celular, lise, morte por inanição, paralisia muscular geral e septicemia (Monnerat, 2007; Vallet-Gely et al., 2008; Ben-Dov, 2014). Além disso, *B. thuringiensis* produz proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), que são secretadas durante a fase vegetativa de crescimento da bactéria (Warren, 1997). Essas proteínas possuem um modo de ação específico, expandindo o espectro do controle biológico. Além de seu uso como biopesticida, o Bt também vem sendo estudado por seu potencial na promoção do crescimento vegetal, contribuindo para o aumento da produtividade agrícola (Kumar et al., 2021).

A produção comercial do primeiro bioinsumo à base de *B. thuringiensis* começou na França em 1938, para aplicação foliar (Fazolin et al., 2007), sob a denominação de ‘Sporeine’ (Capalbo et al., 2004; Brar et al., 2006). O uso de formulações comerciais de Bt, na forma de sprays ou suspensões líquidas, tem se expandido, sendo uma alternativa viável aos pesticidas químicos (Kumar et al., 2021). Com os avanços tecnológicos, seu material genético tem sido modificado para a criação de culturas transgênicas (Bt-GM), que apresentam resistência a insetos (Kumar et al., 2021). Atualmente, o Brasil possui 50 produtos registrados com *Bt* no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2024).

2.5. AVALIAÇÃO DE RISCO SOBRE ABELHAS

O método clássico para avaliar a toxicidade de substâncias ou produtos tóxicos para os organismos é através da estimativa da CL50 (concentração letal que mata 50% dos organismos)

e a DL50 (dose letal que mata 50% dos organismos) cujo efeito de toxicidade observado é a mortalidade. Tanto a CL50 como a DL50 são resultantes de testes que avaliam a toxicidade aguda, ou seja, os efeitos de uma única exposição a uma alta dose ou concentração do agente estressor em um curto espaço de tempo, geralmente até 96 h. Esses parâmetros são utilizados para avaliar o grau de toxicidade aguda, mas não fornecem informações sobre os efeitos a longo prazo ou subletais da exposição (Cham et al., 2019). Os métodos oficiais para a realização destes ensaios estão descritos nos protocolos da OECD (1998).

A abelha *A. mellifera* Linnaeus é o polinizador mais utilizado em estudos de avaliação de risco de pesticidas e biopesticidas devido ao seu valor econômico como polinizador. No entanto, a extrapolação dos resultados de tais estudos para outras espécies de abelhas é questionável devido às diferenças nutricionais, comportamentais e fisiológicas entre as espécies de abelhas. A maioria das pesquisas sobre os efeitos de pesticidas em abelhas têm se concentrado na fase adulta dos insetos, usando principalmente a espécie *A. mellifera* como modelo (Cresswell, 2011; BPBES-REBIPP, 2019), avaliando os efeitos de inseticidas tais como os neonicotinóides e os fenilpirazóis. No que tange os neonicotinóides, eles podem ser aplicados por pulverizações foliares, tratamento de solo ou de sementes (Thompson, 2010; Blacquièrre et al., 2012). Desta forma e por se tratarem de inseticidas sistêmicos, os resíduos destes podem atingir os adultos indiretamente, assim como estar presentes no pólen e no néctar (Blacquièrre et al., 2012). A exposição a produtos desse grupo químico pode gerar níveis agudos de toxicidade expressando efeitos subletais que incluem comportamento desordenado e perda de memória (Van der Sluijs et al., 2013; Delkash-Roudsari et al, 2020; Smith et al., 2020; Siam et al., 2025).

A espécie de abelha sem ferrão *S. aff. depilis* tem sido utilizada em estudos para avaliação dos efeitos de agrotóxicos (Rosa, 2014) e tem sido indicada como espécie nativa mais

adequada para ser proposta como organismo modelo por Rosa-Fontana et al. (2020), por ser uma abelha sem ferrão que tem ninhos populosos e por produzirem muitos ovos diariamente, o que facilita os estudos *in vitro* com essa espécie (Do Carmo Zerbo et al., 2001). Essa espécie de abelha sem ferrão, justamente por essas características biológicas, além da ampla distribuição geográfica no Brasil, visita a diferentes culturas, etc., foi indicada pelo Ibama como um organismo a ser utilizado nas avaliações de risco de agrotóxicos, conforme Pires et al. (2018), além da abelha *Apis mellifera*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o risco de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) sobre as fases imaturas (larval até a emergência) de *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *Scaptotrigona* cf. *postica*, por meio de análise de sobrevivência e tempo de desenvolvimento, com ênfase na determinação de possíveis concentrações críticas de exposição.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (I) Avaliar a mortalidade de imaturos de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* expostos a diferentes concentrações de Btk e Ba.
- (II) Investigar os efeitos subletais dos biocontroladores Btk e Ba sobre o tempo de desenvolvimento das fases larval até a emergência de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica*, verificando se houve variações no desenvolvimento decorrentes da exposição aos biopesticidas.

4. HIPÓTESE

A exposição de imaturos da espécie de abelha sem ferrão *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* ao consumo de alimento contendo bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens* apresenta efeitos tanto letais quanto subletais.

5. MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Microbiologia Ambiental (LMA) e de Entomologia e Fitopatologia (LQCL) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo e nos laboratórios de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) e de Ecologia e Biossegurança (LEB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, Distrito Federal.

5.1. ESPÉCIES DE ABELHA SEM FERRÃO AVALIADAS

Os imaturos da espécie *S. aff. depilis* foram provenientes de 12 colônias mantidas em caixas racionais pertencentes ao meliponário da Embrapa Meio Ambiente localizado em Jaguariúna, São Paulo - Brasil. Os imaturos da espécie *S. cf. postica* foram provenientes de 16 colônias mantidas em dois meliponários, um na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e outro pertencente aos meliponicultores Edinaldo Gonçalves Pontes e Anselmo Ramos Carvalho, área rural localizado na Fercal, em Sobradinho, no Distrito Federal - Brasil.

5.2. VALIDAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS ESTIRPES DE *Bacillus* spp. PARA OS ENSAIOS COM ABELHAS

A avaliação da bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foi realizada utilizando lagartas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de criação em dieta artificial mantida em laboratório. Para a avaliação da bioatividade de *Bacillus amyloliquefaciens* foi utilizado o fungo da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Hypocreales: Nectriaceae), isolado 007 originária da Coleção de Trabalho da Embrapa Algodão, multiplicado em meio de cultura.

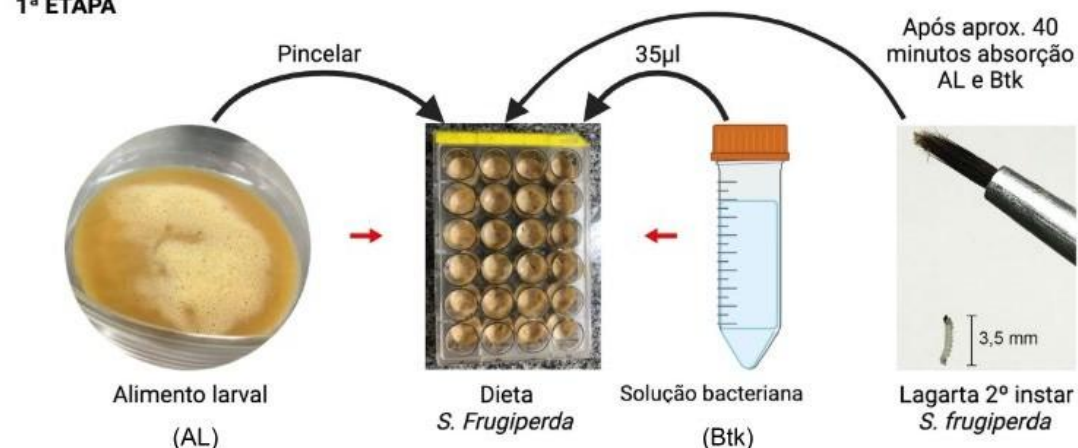
As bactérias *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (estirpe HD-1, S-1450) e *B. amyloliquefaciens* (estirpe CCT-7994), foram produzidas pela empresa SoluBio em biorreatores. A concentração desses produtos foi determinada quanto às UFC (unidades formadoras de colônias) baseados no número de esporos (Monnerat et al., 2020).

5.2.1. BIOATIVIDADE DOS *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* EM *Spodoptera frugiperda*

A bioatividade das estirpes de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* produzidas para os experimentos com as abelhas foi validada em lagartas *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Siqueira, 2008). Para avaliar se a suspensão bacteriana à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* continuava com atividade tóxica após a adição ao alimento das larvas de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica*, foram realizados dois experimentos com *S. frugiperda*, seguindo a metodologia de bioensaio descrita por Siqueira (2008), conforme ilustrado na Figura 1.

Teste de bioatividade

1ª ETAPA



3ª ETAPA



2ª leitura: 7 dias
Copos 50 ml - dieta de transferência

2ª ETAPA

Câmara climatizada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$,
70%U.R. e fotoperíodo de 12 horas.



1ª leitura: 48h
Placa de 24 poços - dieta S. frugiperda

Figura 1: Esquema da sequência de atividades no bioensaio conduzido para verificação da bioatividade de *Bacillus* spp. sobre lagartas de *S. frugiperda* após a incorporação no alimento larval de *Scaptotrigona* spp.

Nos ensaios com lagartas de segundo instar de *S. frugiperda* foram avaliados cinco tratamentos: (1) dieta artificial pura; (2) dieta artificial + água destilada esterilizada (35 µl); (3) dieta artificial + 35 µl de alimento larval de *S. aff. depilis* ou *S. cf. postica*; (4) dieta artificial + 35 µl de alimento larval de *S. aff. depilis* ou *S. cf. postica* + 35 µl de suspensão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* na concentração de 8×10^8 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis* e $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL para *S. cf. postica*; (5) dieta artificial + 35 µl de suspensão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em diluições decimais. Foram realizadas três repetições por tratamento, cada uma contendo 24 lagartas de *S. frugiperda*. A mortalidade foi avaliada 48 h e 168 h após o início do ensaio.

5.2.2. BIOATIVIDADE DOS *Bacillus amyloliquefaciens* EM FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

A bioatividade das estirpes de *B. amyloliquefaciens* utilizadas nos experimentos com abelhas foi previamente validada contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (isolado 007, fornecido pela Embrapa Algodão). O teste seguiu o método de confrontação direta em placas de Petri descrito por Dennis e Webster (1971), com adaptações propostas por Montalvão et al. (2021), visando verificar o efeito inibitório sobre o crescimento micelial do patógeno. A avaliação do antagonismo foi realizada com base em uma escala adaptada de 0 a 5, que considera a porcentagem de crescimento bacteriano frente ao fungo, levando em conta características visuais do desenvolvimento da colônia fúngica *in vitro* (Figura 2).

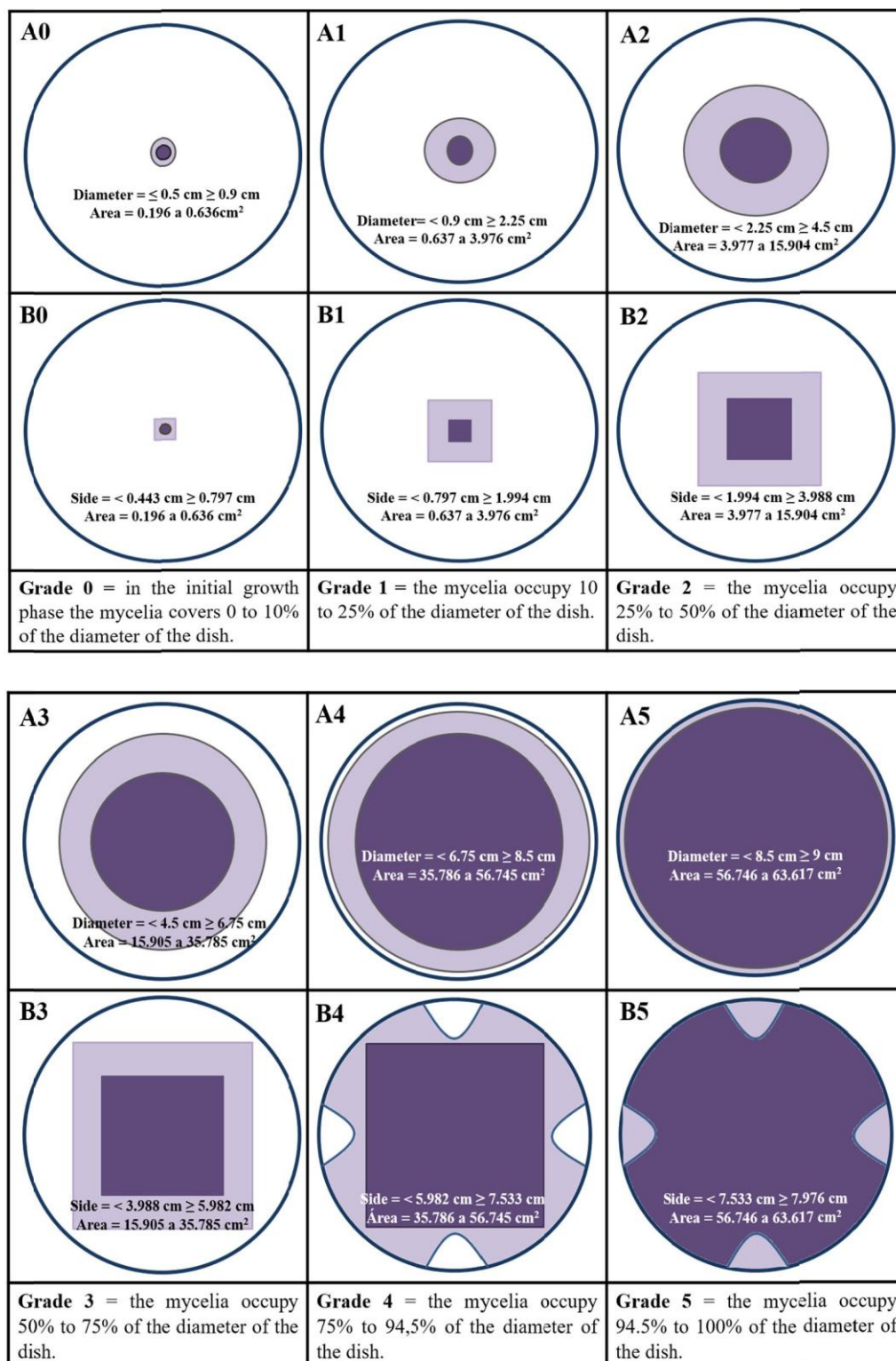


Figura 2: Crescimento de colônias fúngicas em ensaio duplo, conforme proposto por Montalvão. As escalas de A0 a A5 representam o crescimento fúngico sem interferência do antagonista, enquanto as escalas de B0 a B5 representam o crescimento com interferência do antagonista.

Fonte: Montalvão (2021). Com autorização do autor.

Nestes ensaios foram testados dois tratamentos com cinco repetições cada: (1) Meio de cultura + água destilada esterilizada; (2) Meio de cultura + suspensão de de *B. amyloliquefaciens*.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. A leitura do crescimento fúngico, foi avaliada de acordo com a escala de notas adaptada, seguindo a metodologia de Montalvão (2021) foi realizada após 48 e 168 h do início do ensaio.

5.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Bacillus* spp. SOBRE IMATUROS DE *Scaptotrigona* spp.

Para essas avaliações, o alimento larval coletado com micropipeta foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL da marca KASKI para homogeneização da mistura, sendo utilizados 3500 µL para o controle negativo e 3150 µL para os demais tratamentos. Foram preparadas diluições seriadas a partir das suspensões bacterianas com concentrações de *B. amyloliquefaciens* (Ba) de 2×10^8 esporos viáveis/mL, e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) de 8×10^8 e $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL. Aliquotas de 350 µL de cada suspensão foram adicionadas a 3150 µL de alimento larval, realizando-se diluições seriadas até alcançar as concentrações definidas para o ensaio. Por meio de bioensaios *in vitro* com dupla via de exposição (oral e tópica), considerando que as larvas de abelhas sem ferrão são posicionadas diretamente sobre o alimento larval natural suplementado com os biocontroladores. Larvas de 1 a 3 dias de *S. aff. depilis* foram expostas às seguintes concentrações de Btk: 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 , 8×10^7 esporos viáveis/mL; e Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 esporos viáveis/mL e *S. cf. postica* à Btk nas concentrações: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$, $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL. Os experimentos incluíram três tipos de controle:

Controle negativo (CN): apenas alimento larval; Controle absoluto (CA): alimento larval + água destilada; Controle positivo (CP): alimento larval + tiametoxam (Actara®) na dose de 0,30 g i.a. L⁻¹. Para o controle positivo, foram misturados 350 µL da solução de tiametoxam a 3150 µL de alimento larval.

Para avaliar a toxicidade de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e *B. amyloliquefaciens* sobre os imaturos de abelhas sem ferrão, baseou-se na técnica de criação *in vitro* de rainhas de abelhas *A. mellifera* descrita por Camargo (1972). Essa metodologia foi aprimorada por Menezes et al. (2013) para criação de rainhas de *Scaptotrigona* spp., sob condições controladas e, posteriormente adaptada por Rosa (2014) para o desenvolvimento de operárias desse mesmo gênero, conforme sugerido por (Siqueira, 2008). Esse método consiste na utilização de 35 µl de alimento larval natural acondicionado em células de cria artificiais (figura 3), que corresponde ao volume total de alimento consumido por uma larva de operária de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* durante seu ciclo larval.

Todas as larvas receberam tratamento idêntico em relação à umidade relativa do ar (UR). Após a transferência das larvas, as placas de Elisa sem tampa (microplacas de criação) foram colocadas dentro de placas de Petri plásticas para cultura celular estéreis, de 150 x 25 mm com ventilação, mantendo-se de 100% UR através da adição de água destilada nas placas de Petri, nos primeiros seis dias. Após a completa ingestão do alimento pelas larvas, a UR foi reduzida para 75% mediante a adição da solução de NaCl, onde permanecerá até o final do bioensaio.

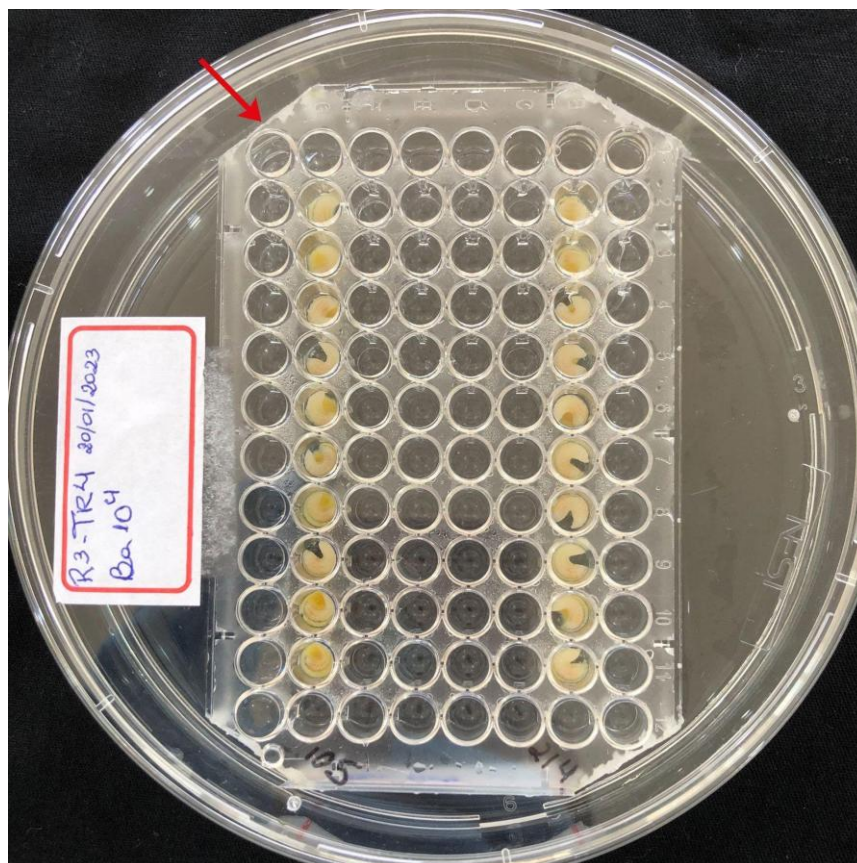


Figura 3: Microplacas de acrílico de 96 poços em fundo “U” (86 x 128mm) com cavidades (7mm de diâmetro e 10 mm de profundidade) utilizadas como células de cria artificiais para as larvas das abelhas sem ferrão com corte das pontas laterais acondicionadas em placa de petri com ventilação modelo Corning 750.

As larvas foram mantidas em uma estufa tipo B.O.D, no escuro, a uma temperatura média de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ seguindo o protocolo de Menezes et al. (2013). Essa temperatura está dentro da faixa natural para a espécie, que é de $27,6 - 31,8^\circ\text{C}$ a variação das temperaturas internas das regiões do favo de cria (Zucchi e Sakagami, 1972). No entanto, de acordo com Siqueira (2008), a temperatura pode variar $\pm 1^\circ\text{C}$ dependendo da localização das placas de Petri na estufa. Para minimizar o efeito dessa variação na temperatura, a posição das placas de Petri contendo as células artificiais diariamente trocadas dentro da estufa. As condições de temperatura e escuridão foram mantidas durante todo o experimento.

As larvas de *S. aff. depilis* foram obtidas de favos de cria de seis colônias, enquanto as larvas de *S. cf. postica* foram obtidas de 16 colônias. Em ambos os casos, cada colônia corresponde a uma repetição, com 20 larvas por réplica em cada tratamento.

Diariamente, após a transferência larval para os tratamentos, foi registrada a mortalidade dos indivíduos desde o estágio larval até a emergência. Larvas mortas foram identificadas pela ausência de movimento dos espiráculos e, frequentemente, pela coloração escurecida do corpo. Pré-pupas, pupas e imagos foram identificadas como mortas quando apresentavam alterações anormais na coloração corporal (Figura 4).

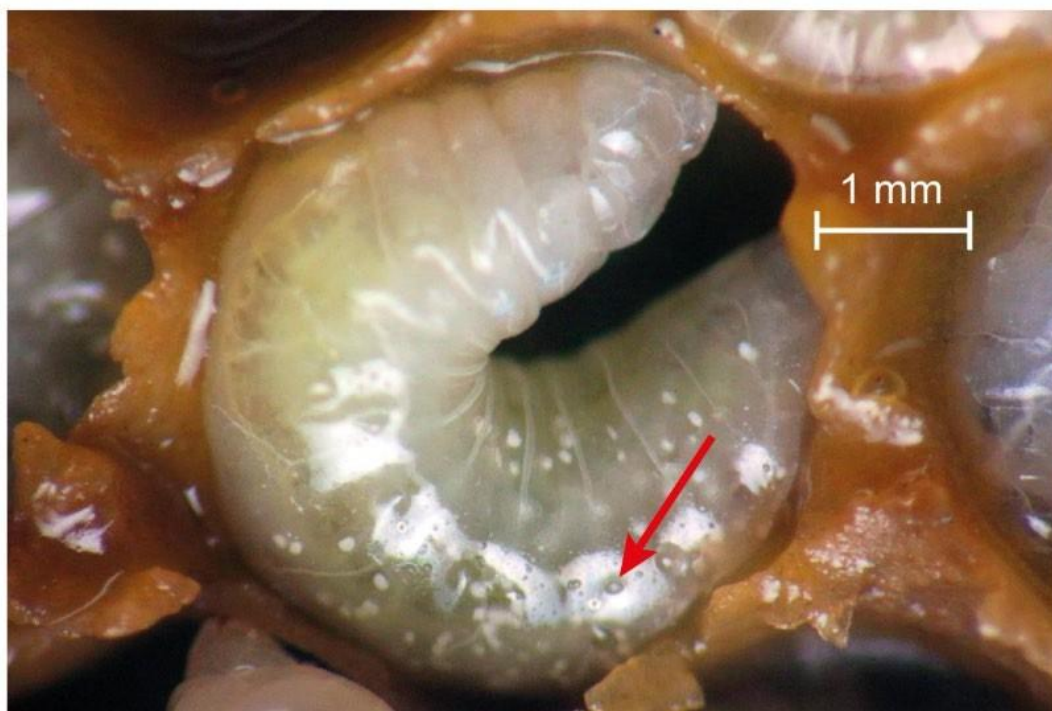


Figura 4: Em destaque a estrutura espiráculo (órgãos de respiração). Órgãos de respiração da larva de abelha sem ferrão.

Foto: Daniel Daldegan.

5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as variáveis taxas de mortalidade por tratamento e o tempo médio (em dias) do ciclo de vida, tanto das lagartas quanto das larvas das abelhas, avaliadas nos estágios de larvas até emergência, foi realizada, inicialmente, uma análise descritiva exploratória. Esta análise incluiu a aplicação de estatísticas de posição e dispersão, compreendendo a média, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação. Posteriormente, esses dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância das diferenças entre os tratamentos.

A normalidade dos resíduos foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade (homogeneidade da variância) avaliada pelo teste de Bartlett. Para comparação entre médias, utilizou-se o teste de Tukey para identificar diferenças específicas entre os tratamentos. Nos casos em que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade necessários para a aplicação da análise de variância (ANOVA) não foram atendidos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A bioatividade do bioinseticida *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após a incorporação no alimento larval da abelha sobre as larvas de *S. frugiperda*, foi avaliada comparando os números médios de larvas mortas nos cinco tratamentos utilizando ANOVA, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer.

Para comparar a bioatividade do bioinseticida *B. amyloliquefaciens* em relação ao fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi utilizado uma análise descritiva através das medidas geradas pelo método proposto por Montalvão et al. (2021). Os efeitos das diferentes concentrações na dieta sobre os estágios imaturos foram avaliados por meio da comparação do número médio de indivíduos mortos entre os diferentes tratamentos.

A curva de sobrevivência dos indivíduos em cada tratamento foi analisada através da curva de Kaplan-Meier, conforme descrito por Clark et al. (2003). O teste de Log-rank foi aplicado para comparação das curvas de sobrevivência entre os tratamentos. Dentro dessa análise, empregou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox (regressão de Cox) para calcular o Hazard Ratio (HR). Para conduzir tais análises, foi utilizado o programa R, versão 4.2.1 (R Development Core Team, 2022), com auxílio dos pacotes "survival" e "ggfortify" para análise de sobrevivência, e "ExpDes.pt" e "ggplot2" para análise de variância e comparações gráficas dos tratamentos, respectivamente.

6. RESULTADOS

6.1. BIOATIVIDADE DO BIOINSETICIDA DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* EM LAGARTAS DE *S. frugiperda*

Os bioensaios com a adição de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e alimento larval das abelhas *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *S. cf. postica* à dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* indicaram que a composição do alimento das abelhas não interferiu na toxicidade do bioinseticida após sete dias de incubação.

Foi observada variação significativa na mortalidade das lagartas entre os tratamentos, tanto para *S. aff. depilis* (ANOVA: $F = 488,95$; g.l. = 4; $p < 0,05$; Figura 5) quanto para *S. cf. postica* ($F = 771,50$; g.l. = 4; $p < 0,05$; Figura 6). O *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* causou mortalidade da lagarta significativamente maior (100%) do que os tratamentos controle misturados apenas com água destilada ou misturados ao alimento larval puro de *Scaptotrigona*; Não houve diferenças significativas na mortalidade das lagartas alimentadas com dieta artificial

contendo Btk isoladamente ou combinado ao alimento larval das abelhas, ambas obtiveram 100% de mortalidade, evidenciando que o efeito tóxico é exclusivamente atribuído à ação do bioinseticida, sem interferência do alimento larval das abelhas.

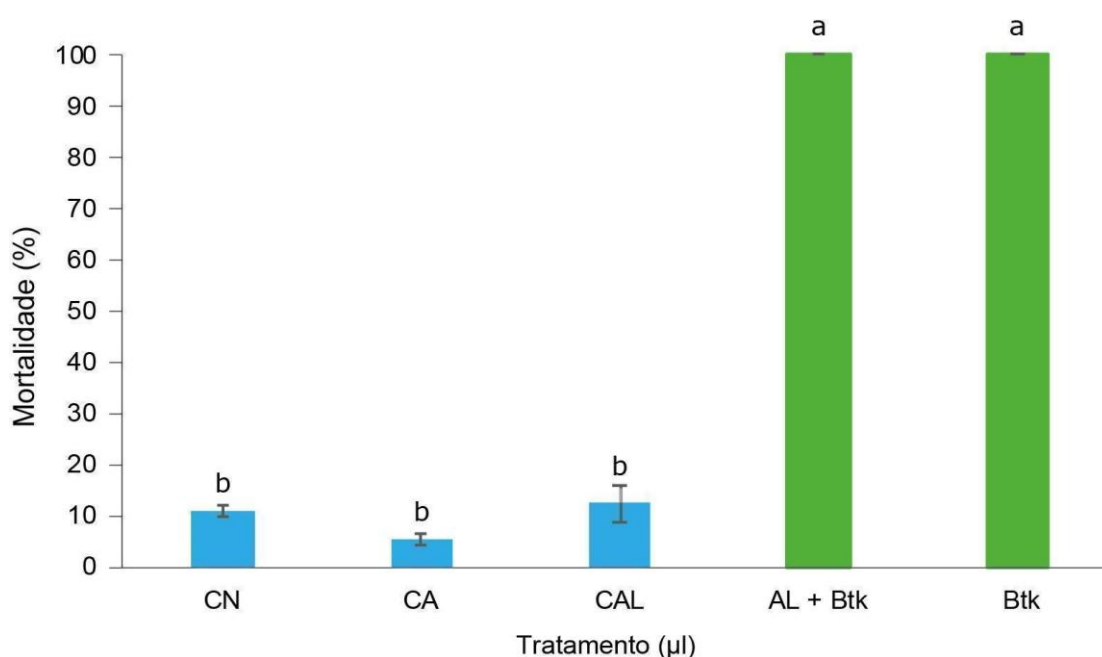


Figura 5: Mortalidade média (%) de *Spodoptera frugiperda* (\pm erro padrão) submetidas à dieta artificial pura (CN - controle negativo); dieta com água (CA - controle absoluto); dieta com alimento larval de *S. aff. depilis* (CAL - controle com alimento larval); dieta com alimento larval + Btk (AL+Btk - 8×10^8 esporos viáveis/mL); dieta com suspensão de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - Btk (8×10^8 esporos viáveis/mL). As avaliações de mortalidade foram realizadas sete dias após a montagem dos bioensaios. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de Tukey).

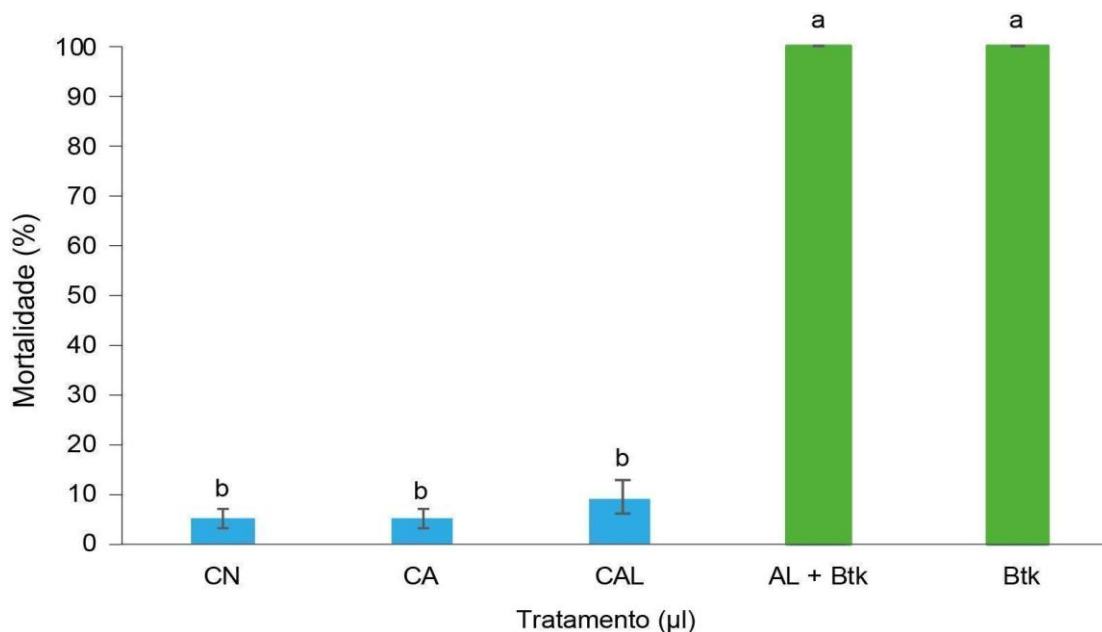


Figura 6: Mortalidade média (%) de *Spodoptera frugiperda* (\pm erro padrão) submetidas à dieta artificial pura (CN - controle negativo); dieta com água (CA - controle absoluto); dieta com alimento larval de *S. aff. depilis* (CAL - controle com alimento larval; dieta com suspensão de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - Btk (Btk - $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL); dieta com alimento larval + Btk (AL+Btk - $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL). As avaliações foram realizadas em sete dias após a montagem dos bioensaios. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$, teste de Tukey).

6.2. BIOATIVIDADE DE BIOPESTICIDA *Bacillus amyloliquefaciens* CONTRA O

FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*

A bioatividade do biofungicida à base de *Bacillus amyloliquefaciens* foi confirmada no pré-teste, sendo evidenciada pela formação de halos de inibição ao redor das colônias do patógeno. Após sete dias, o crescimento micelial do fungo foi significativamente reduzido, com taxas de inibição entre 50% e 75% em relação ao disco inicial, de acordo com a escala de avaliação número 3 (Figura 2B3) e conforme ilustrado na Figura 7C. Tais evidências asseguram sua viabilidade para uso nos experimentos subsequentes de avaliação de risco, voltados à análise de possíveis efeitos letais e subletais sobre os estágios imaturos de abelhas sem ferrão.

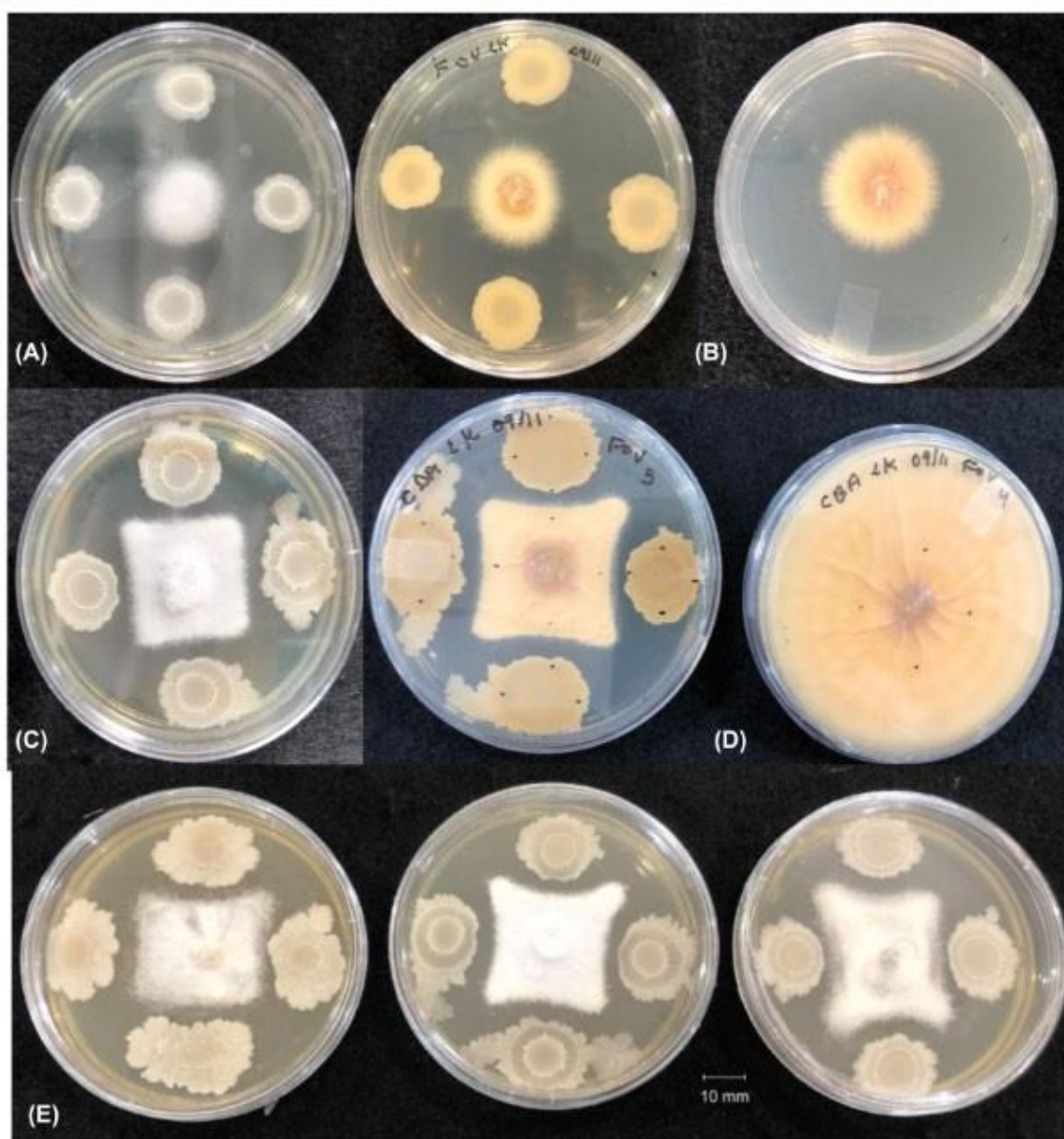


Figura 7: Bioensaio de confronto direto entre o antagonista *Bacillus amyloliquefaciens*, na concentração de 2×10^8 esporos viáveis/mL, contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. (A) Leitura com 48 horas: efeito biocontrolador sobre o fungo. (B) Controle negativo: crescimento fúngico sem interferência do antagonista (leitura com 48 horas). (C) Leitura com 168 horas: efeito antagonista com redução do crescimento micelial (escala B3). (D) Controle negativo (168 horas): crescimento fúngico completo sem interferência do antagonista. (E) Bioensaio em triplicata.

6.3. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE BIOPESTICIDAS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* E DE *Bacillus amyloliquefaciens* EM IMATUROS DE ABELHAS DO GÊNERO *Scaptotrigona* spp.

6.3.1 Sobrevivência e taxa de mortalidade

Em virtude da mortalidade acima de 15% nos tratamentos controle negativo (alimento larval puro) e absoluto (alimento larval + água) no estágio de desenvolvimento de pupa, avaliou-se a mortalidade somente até a fase de pré-pupa. Os imaturos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* e *S. cf. postica* não sobreviveram por mais de três e dois dias, respectivamente, após a exposição ao tiametoxam. Por outro lado, os controles negativos (alimento larval puro) e absoluto (alimento larval suplementado com água destilada) apresentaram taxas de sobrevivência de 90,0% e 91,7% para *S. aff. depilis* (Figura 8), e de 90,6% e 90,0% para *S. cf. postica* (Figura 9).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* (Btk) em *S. aff. depilis*

As curvas de sobrevivência obtidas pelos estimadores de Kaplan-Meier e as análises de log-rank indicaram diferenças estatísticas significativas no tratamento com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* a concentração de 8×10^7 esporos viáveis/mL em *S. aff. depilis* (Log-rank: $\chi^2 = 459,9$; $p < 0,05$; Anexo III) e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$, $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL em *S. cf. postica* (Logrank: $X^2 = 1342,0$; $p < 0,05$; Anexo V), ambos em comparação ao controle negativo.

Em *S. aff. depilis*, a comparação entre os diferentes tratamentos indicou uma redução significativa na sobrevivência dos imaturos expostos à dieta contendo a concentração mais alta de Btk 8×10^7 esporos viáveis/mL ($\chi^2 = 372$; $p < 0,05$; Tabela 1), a partir do nono dia de

desenvolvimento larval (fase de pré-pupa), observou-se uma taxa de mortalidade de 50% (Figura 8), alcançando 61,7% no 17º dia de avaliação (Tabela 3).

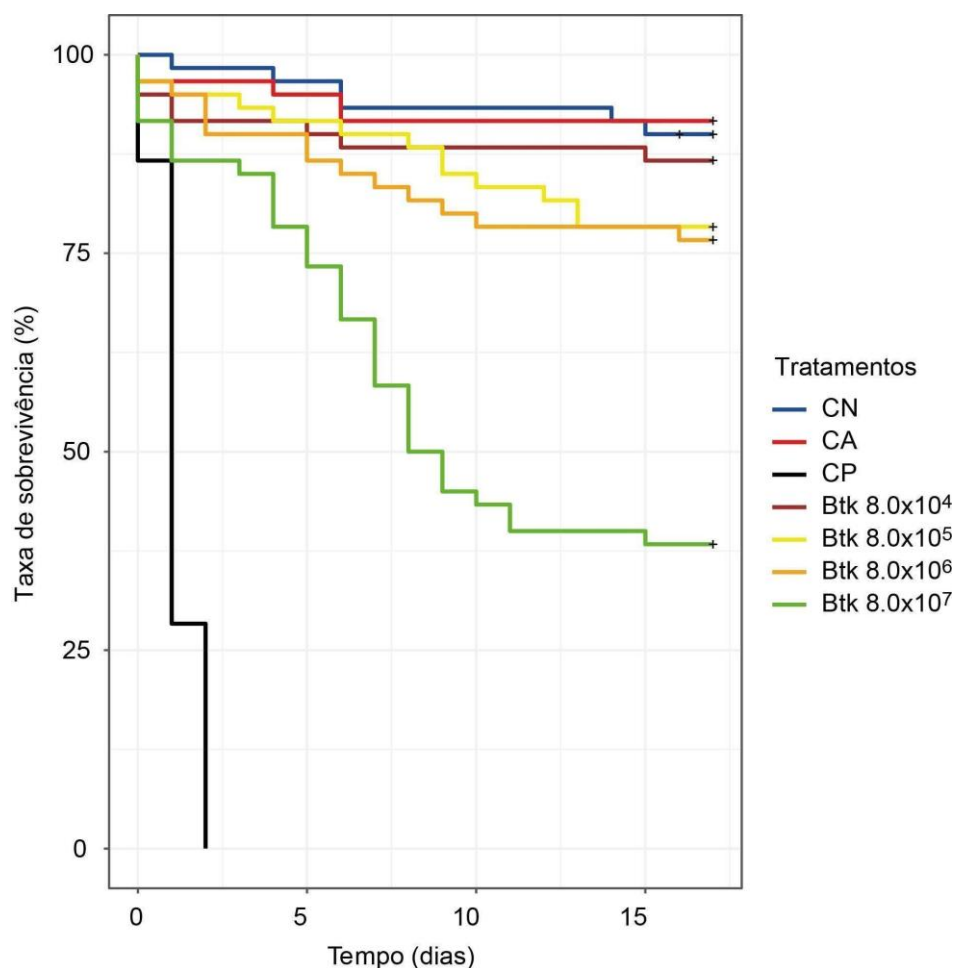


Figura 8. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) nas concentrações de 8 x 10⁴, 8 x 10⁵, 8 x 10⁶ e 8 x 10⁷ esporos viáveis/mL.

Não foi observada diferença estatística significativa na probabilidade de sobrevivência dos imaturos entre os grupos controle (negativo e absoluto) e os tratamentos que utilizaram as

três menores concentrações de Btk (Tabela 1) ao longo dos 17 dias de avaliação. As taxas de sobrevivência foram de 90,0% (IC 95%: 82,4–97,6%) no controle negativo (alimento larval puro) e 91,7% (IC 95%: 84,7–98,7%) no controle absoluto (alimento suplementado com água destilada). Nos tratamentos com Btk, as concentrações de 8×10^4 , 8×10^5 e 8×10^6 esporos viáveis/mL resultaram em taxas de 86,7% (IC 95%: 78,1 – 95,3%), 78,3% (IC 95%: 67,9 – 88,8%) e 76,7% (IC 95%: 67,9 – 88,8%), respectivamente (Anexo VI).

Embora as taxas de sobrevivência nos controles tenham sido ligeiramente superiores às observadas nos tratamentos com Btk nas concentrações de 8×10^4 , 8×10^5 e 8×10^6 esporos viáveis/mL, essas diferenças não foram estatisticamente relevantes. Os valores de erro padrão (SE) referentes aos tratamentos variaram de 0,3% a 1,6%.

Tabela 1: Resultados da análise das curvas de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e das comparações pareadas entre os tratamentos avaliados quanto aos possíveis efeitos da cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre imaturos de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. Os tratamentos consistiram em: CN (controle negativo – alimento larval puro), CA (controle absoluto – alimento larval com adição de água destilada), CP (controle positivo – tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹) e quatro concentrações do biopesticida à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk): 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 e 8×10^7 esporos viáveis/mL.

Tratamento		N	Observado	Esperado	(OE) ² /E	(OE) ² /V
CN - Controle negativo		60	6	23,48	13,01	16,48
CA - Controle absoluto		60	5	23,04	14,13	17,81
CP - Controle positivo		60	60	9,72	260,14	324,58
Btk 8×10^4		60	8	22,33	9,20	11,52
Btk 8×10^5		60	13	22,48	4,00	5,01
Btk 8×10^6		60	13	21,99	3,68	4,59
Btk 8×10^7		60	37	18,96	17,16	21,04
X ² =372 on 6 degrees of freedom, p= <2e-16						
Tratamento	CN	CA	CP	8×10^4	8×10^5	8×10^6
CA - Controle absoluto	0,819	-	-	-	-	-
CP - Controle positivo	0,000	0,000	-	-	-	-
Btk 8×10^4	0,590	0,439	0,000	-	-	-
Btk 8×10^5	0,109	0,077	0,000	0,324	-	-
Btk 8×10^6	0,108	0,076	0,000	0,324	0,927	-
Btk 8×10^7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Os tratamentos utilizados nas comparações aos pares e nas colunas de tratamentos são as mesmas.

Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) em *S. cf. postica

Em *S. cf. postica*, quando os resultados de todos os tratamentos foram combinados, também resultou em uma redução significativa na sobrevivência dos imaturos expostos à dieta contendo a concentração mais alta de Btk $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL ($\chi^2 = 987$; $p < 0,05$; Tabela 2), com 50% de mortalidade (Figura 9) a partir do 13º dia de desenvolvimento larval (fase de pré-pupa) e alcançando uma taxa de mortalidade de 53,7% no 17º dia de avaliação (Tabela 3).

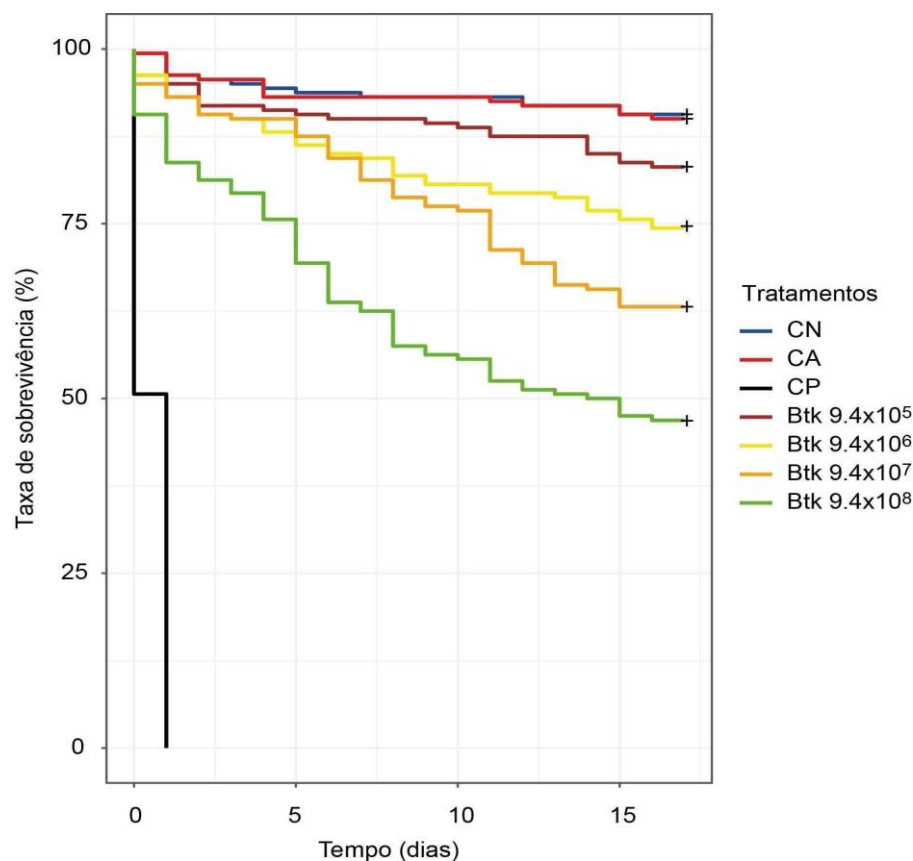


Figura 9. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* cf. *postica* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) nas concentrações de $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL.

Não foi observada diferença significativa na probabilidade de sobrevivência dos imaturos entre os controles (negativo e absoluto) e o tratamento com a menor concentração de Btk (Tabela 2). As taxas de sobrevivência foram de 90,6% (IC 95%: 86,1–95,1%) no controle negativo (alimento larval puro), 90,0% (IC 95%: 85,4–94,6%) no controle absoluto (alimento suplementado com água destilada), enquanto no tratamento com a menor concentração de Btk ($9,4 \times 10^5$ esporos viáveis/mL) foi de 83,1% (IC 95%: 77,3–88,9%). Além disso, não houve diferença significativa na comparação entre as concentrações de $9,4 \times 10^5$ (83,1%; IC 95%: 77,3–88,9%) e $9,4 \times 10^6$ (74,4%; IC 95%: 67,6–81,1%), nem entre $9,4 \times 10^6$ (74,4%; IC 95%: 67,6–81,1%) e $9,4 \times 10^7$ (63,1%; IC 95%: 55,6–70,6%) esporos viáveis/mL (Anexo VIII).

Embora as taxas de sobrevivência nos controles negativo e absoluto tenham sido ligeiramente superiores às observadas nos tratamentos com Btk nas concentrações de $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$ e $9,4 \times 10^7$ esporos viáveis/mL, essas diferenças não foram estatisticamente relevantes na comparação entre eles. Os valores de erro padrão (SE) referentes aos tratamentos variaram de 0,3 a 0,9%.

Tabela 2: Resultados da análise da curva de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e teste de comparações pareadas entre cada tratamento dos experimentos para avaliar os possíveis efeitos de cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) sobre imaturos de *S. cf. postica*. CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. cf. postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL.

Tratamento		N	Observado	Esperado	(OE) ² /E	(OE) ² /V
CN - Controle negativo		160	15	66.7	40,0848	51,445
CA - Controle absoluto		160	16	66.6	38,4842	49,381
CP - Controle positivo		160	160	25.6	705,3228	897,154
Btk $9,4 \times 10^5$		160	27	64.8	22,0575	28,139
Btk $9,4 \times 10^6$		160	41	62.9	7,6111	9,656
Btk $9,4 \times 10^7$		160	59	61.4	0,0928	0,117
Btk $9,4 \times 10^8$		160	85	55.0	16,4102	20,460
X ² =987 on 6 degrees of freedom, p= <2e-16						
Tratament	CN	CA	CP	$9,4 \times 10^5$	$9,4 \times 10^6$	$9,4 \times 10^7$
CA - Controle absoluto	0,85596	-	-	-	-	-
CP - Controle positivo	0,00000	0,00000	-	-	-	-
Btk $9,4 \times 10^5$	0,05648	0,07499	0,000	-	-	-
Btk $9,4 \times 10^6$	0,00022	0,00039	0,000	0,06211	-	-
Btk $9,4 \times 10^7$	0,00000	0,00000	0,000	0,00012	0,05251	-
Btk $9,4 \times 10^8$	0,00000	0,00000	0,000	0,00000	0,00000	0,00107

Os tratamentos utilizados nas comparações aos pares e nas colunas de tratamentos são as mesmas.

Em ambas as espécies, a ingestão de Btk não afetou significativamente a sobrevivência nas menores concentrações testadas, mas nas concentrações mais altas, comprometeu a sobrevivência das larvas. Para *S. aff. depilis*, as maiores taxas de mortalidade foram observadas com Btk a concentração de 8×10^7 esporos viáveis/mL, atingindo 61,7% (Tabelas 1 e 3), enquanto que para *S. cf. postica*, as maiores taxas de mortalidade foram observadas com Btk a $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL, atingindo 36,9% e 53,7%, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3: Taxa de mortalidade de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona aff. depilis* e *Scaptotrigona cf. postica* expostas a quatro concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) avaliados diariamente até as larvas empuparem (até o 17º dia). CN (Controle negativo: alimento larval puro de *Scaptotrigona* spp.), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), seguido das concentrações de Btk: 8×10^4 , 8×10^5 , 8×10^6 , 8×10^7 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis*, e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL para *S. cf. postica*.

Tratamentos	Abelha canudo <i>S. aff. depilis</i>	Tratamentos	Abelha Mandaguari <i>S. cf. postica</i>
CN - Controle negativo	10,0%	CN - Controle negativo	9,4%
CA - Controle absoluto	8,3%	CA - Controle absoluto	10,0%
CP - Controle positivo	100,0%	CP - Controle positivo	100,0%
Btk 8×10^4	13,3%	Btk $9,4 \times 10^5$	16,9%
Btk 8×10^5	21,7%	Btk $9,4 \times 10^6$	25,0%
Btk 8×10^6	23,3%	Btk $9,4 \times 10^7$	36,9%
Btk 8×10^7	61,7%	Btk $9,4 \times 10^8$	53,7%

Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) em *S. aff. depilis

As curvas de sobrevivência obtidas pelos estimadores de Kaplan-Meier e as análises de log-rank indicaram diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos com *B. amyloliquefaciens*, Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 esporos viáveis/mL sobre *S. aff. depilis* (Log-rank: $\chi^2 = 551,0$; $p < 0,05$; Anexo V).

Em *S. aff. depilis*, quando os resultados de todos os tratamentos foram combinados, foi observada uma redução significativa na sobrevivência dos imaturos expostos à dieta contendo a concentração mais alta de Ba 2×10^7 esporos viáveis/mL ($\chi^2 = 422$; $p < 0,05$; Tabela 6). No entanto, até o término do bioensaio, não se alcançou a taxa de mortalidade de 50%, correspondente à mediana, sendo registrada uma mortalidade máxima de 33,3% no 17º dia de avaliação (Tabela 3; Figura 12).

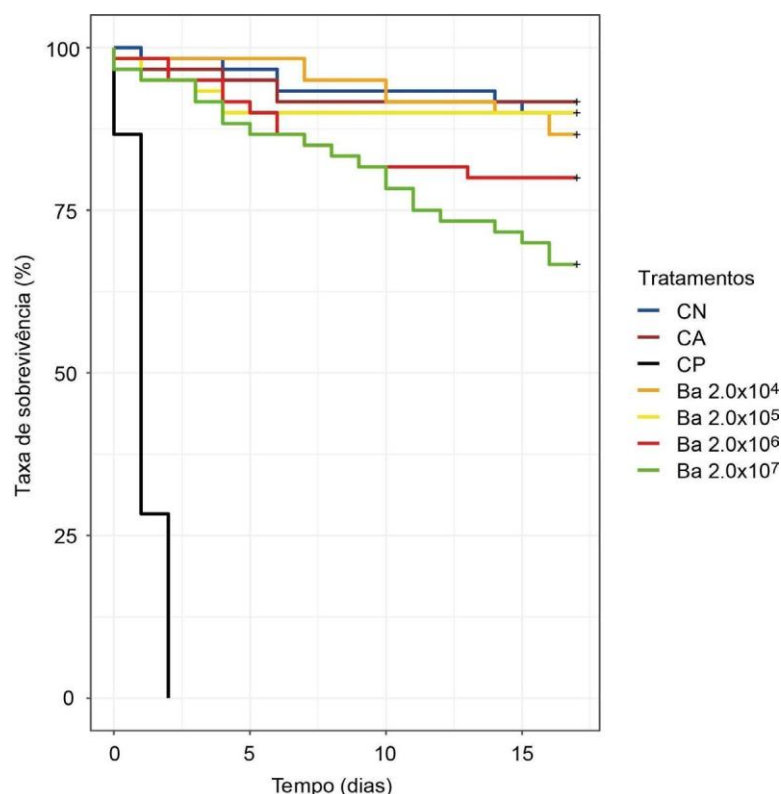


Figura 10. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para larvas de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae: Meliponini, abelha canudo) criados *in vitro* expostos durante o ciclo larval aos tratamentos: CN - Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*, CA - Controle absoluto: alimento larval + água destilada, CP - Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹, *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) nas concentrações de 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL.

Não foi observada uma redução significativa na probabilidade de sobrevivência dos imaturos entre os controles negativo, absoluto e os tratamentos com as menores concentrações de Ba (Tabela 4). As taxas de sobrevivência foram de 90,0% (IC 95%: 82,4–97,6%) no controle negativo (alimento larval puro), 91,7% (IC 95%: 84,7–98,7%) no controle absoluto (alimento suplementado com água destilada) e nos tratamentos com Btk nas concentrações de 2×10^4 (86,7%; IC 95%: 78,1–95,3%), 2×10^5 (90,0%; IC 95%: 82,4–97,6%), 2×10^6 (80,0%; IC 95%: 69,9–90,1%) esporos viáveis/mL (Anexo VII). Além disso, não houve diferença significativa na comparação entre as concentrações de 2×10^6 (80,0%; IC 95%: 69,9–90,1%) e 2×10^7 (70,0%; IC 95%: 58,4–81,6%) esporos viáveis/mL.

Embora as taxas de sobrevivência nos controles negativo e absoluto tenham sido ligeiramente superiores às observadas nos tratamentos com Ba nas concentrações de 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL, essas diferenças não foram estatisticamente relevantes. Os valores de erro padrão (SE) referentes aos tratamentos variaram de 0,3% a 1,7%.

Tabela 4: Resultados da análise da curva de sobrevivência pelo teste log-rank (p-value) e teste de comparações pareadas entre cada tratamento dos experimentos de possíveis efeitos de cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) sobre imaturo de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. aff. depilis*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL.

Tratamento		N	Observado	Esperado	(OE) ² /E	(OE) ² /V
CN - Controle negativo		60	6	18,28	8,2521	10,2971
Ba 2×10^6		60	12	17,58	1,7700	2,1931
Ba 2×10^7		60	18	17,14	0,0435	0,0537
CA - Controle absoluto		60	5	17,94	9,3359	11,6067
CP - Controle positivo		60	60	8,03	336,1965	413,6083
Ba 2×10^4		60	8	18,24	5,7465	7,1668
Ba 2×10^5		60	6	17,79	7,8139	9,6999
X ² =422 on 6 degrees of freedom, p= <2e-16						
Tratamento	CN	2×10^6	2×10^7	CA	CP	2×10^4
Ba 2×10^6	0,2077	-	-	-	-	-
Ba 2×10^7	0,0156	0,3548	-	-	-	-
CA - Controle absoluto	0,8186	0,1419	0,0097	-	-	-
CP - Controle positivo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
Ba 2×10^4	0,7386	0,3841	0,0458	0,5563	0,0000	-
Ba 2×10^5	0,9492	0,2446	0,0198	0,8167	0,0000	0,7386

Os tratamentos utilizados nas comparações aos pares e nas colunas de tratamentos são as mesmas.

Tabela 5: Taxa de mortalidade de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona aff. depilis* expostas a quatro concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) avaliados diariamente até as larvas empuparem (até o 17º dia). CN (Controle negativo: alimento larval puro de *Scaptotrigona* spp.), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), seguido das concentrações de Ba: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 e 2×10^7 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis*.

Tratamentos	Abelha canudo <i>S. aff. depilis</i>
CN - Controle negativo	10,0%
CA - Controle absoluto	8,3%
CP - Controle positivo	100,0%
Ba 2×10^4	13,3%
Ba 2×10^5	10,0%
Ba 2×10^6	20,0%
Ba 2×10^7	33,3%

6.3.2 Tempo médio do ciclo de vida

Além da mortalidade, a exposição ao *B. thuringiensis* var. *kurstaki* também foi avaliada quanto à possível interferência no tempo de desenvolvimento dos imaturos. No caso de *S. aff. depilis*, contudo, não foi possível estimar o tempo médio de desenvolvimento dos diferentes estágios, devido à ausência de registro individualizado da mortalidade das larvas, já que o número de larvas mortas era registrado diariamente por tratamento.

Para *S. cf. postica*, por outro lado, foi possível avaliar o tempo de desenvolvimento de forma precisa. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos para os estágios larval ($F = 0,633$; g.l. = 5; $p > 0,05$) e pré-pupal ($F = 0,268$; g.l. = 5; $p > 0,05$) (Tabela 5). A ingestão de alimento larval contendo Btk não influenciou significativamente a duração média do desenvolvimento quando comparada aos controles negativo e absoluto.

Tabela 6: Tempo médio (em dias) do ciclo de vida de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona cf. postica* expostas a diferentes concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), avaliadas diariamente até a fase de empupamento (até 17º dia). Os tratamentos testados foram: CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S. cf. postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹), e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL.

Tratamentos	Abelha Mandaguari- <i>S. cf. postica</i>			
	Larva (L)		Pré-pupa (PP)	
	m	dp	m	dp
CN - Controle negativo	14,64a	±1,39	4,20a	±1,27
CA - Controle absoluto	14,37a	±1,49	4,12a	±1,25
Btk $9,4 \times 10^5$	14,60a	±1,27	4,28a	±1,05
Btk $9,4 \times 10^6$	14,93a	±1,31	3,99a	±1,25
Btk $9,4 \times 10^7$	14,89a	±1,44	4,07a	±1,48
Btk $9,4 \times 10^8$	14,43a	±1,15	4,07a	±1,11
Anova	F=0,633		F=0,268	

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos, pelo teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (g.l. = 5; $p > 0,05$).

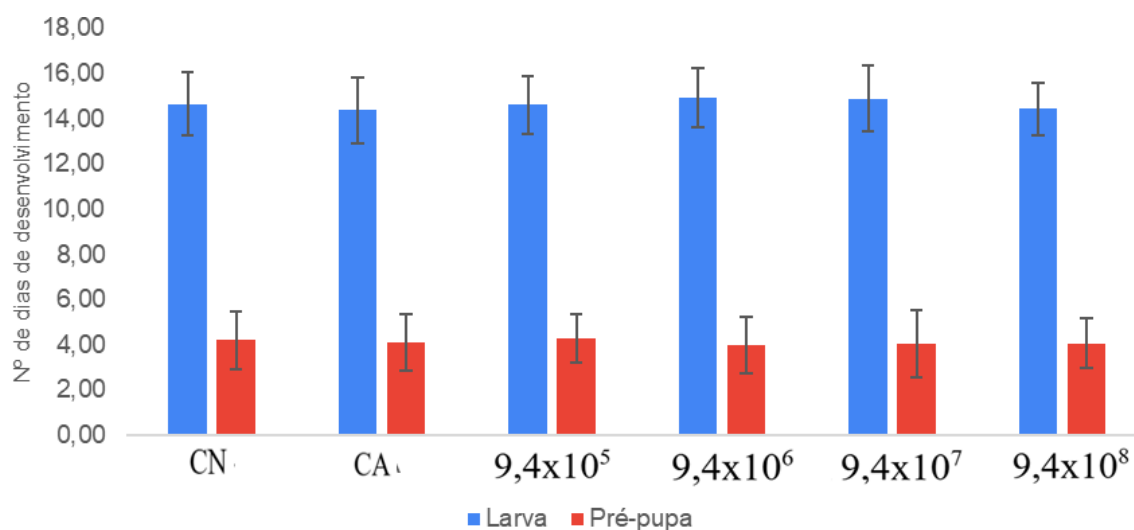


Figura 11. Tempo médio (em dias) do ciclo de vida de imaturos de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona* cf. *postica* expostas a diferentes concentrações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), avaliadas diariamente até a fase de empupamento (até 17º dia). Os tratamentos testados foram: CN (Controle negativo: alimento larval puro de *S.* cf. *postica*), CA (Controle absoluto: alimento larval + água destilada), CP (Controle positivo: Tiametoxam a 0,30 g i.a. L⁻¹) e Btk: $9,4 \times 10^5$, $9,4 \times 10^6$, $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL. As colunas representam as médias acompanhadas do erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos, pelo teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (g.l. = 5; $p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

7.1 Bioatividade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em *S. frugiperda*

Os tratamentos contendo Btk, independentemente da presença do alimento larval, resultaram em taxas de mortalidade significativamente superiores em comparação aos controles, compostos por dieta artificial pura, dieta com água destilada e dieta contendo apenas alimento de *S. aff. depilis*. e *S. cf. postica*. Esses resultados confirmam a bioatividade do biopesticida contra *S. frugiperda*, mesmo quando incorporado ao alimento das abelhas, indicando que este não interferiu na toxicidade do biopesticida.

7.2 Bioatividade de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

A bioatividade do biofungicida à base de *B. amyloliquefaciens* foi confirmada no pré-teste, sendo evidenciada pela formação de halos de inibição ao redor das colônias do patógeno. Após sete dias, o crescimento micelial do fungo foi significativamente reduzido, com taxas de inibição entre 50% e 75% em relação ao disco inicial, de acordo com a escala de avaliação número 3 (Figura 2B3) e conforme ilustrado na Figura 7C. Tais evidências asseguram sua viabilidade para uso nos experimentos subsequentes de avaliação de risco, voltados à análise de possíveis efeitos letais e subletais sobre os estágios imaturos de abelhas sem ferrão.

7.3 Toxicidade de biopesticidas *Bacillus* spp. em imaturos de *Scaptotrigona* spp.

7.3.1 Sobrevivência e taxa de mortalidade

Os imaturos de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* não sobreviveram por mais de três e dois dias, respectivamente, após a exposição ao tiametoxam, confirmando a toxicidade letal do

controle positivo. Por outro lado, os controles negativos (alimento larval puro) e absoluto (alimento larval suplementado com água destilada) apresentaram taxas de sobrevivência de 90,0% e 91,7% para *S. aff. depilis* (Figura 8), e de 90,6% e 90,0% para *S. cf. postica* (Figura 9), respectivamente, demonstrando que a metodologia utilizada nos bioensaios apresenta foi adequada para o desenvolvimento larval (OECD, 2013, 2017, 2021). A temperatura de 28 °C, utilizada para a realização dos bioensaios, é considerada ideal tanto para o desenvolvimento dos imaturos das espécies de abelhas estudadas, conforme Menezes et al. (2013), e quanto para o crescimento das bactérias testadas, de acordo com Montalvão et al. (2021). Dessa forma, essa condição experimental assegurou a exposição adequada dos organismos à temperatura apropriada para seu desenvolvimento. As larvas de *S. aff. depilis* e *S. cf. postica* ingeriram completamente o alimento larval oferecido (35 µL/larva), indicando que *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens* não afetaram o comportamento alimentar das larvas.

No entanto, foi registrada mortalidade superior a 15% nos controles negativo e absoluto durante a fase de pupa, além da ocorrência de má-formações em alguns indivíduos, inclusive nos tratamentos controle. Essa resposta adversa registrada na fase de pupa sugere que a estrutura utilizada para a criação in vitro (microplaca de polietileno tipo Elisa) pode não ter sido adequada para suportar o desenvolvimento de *Scaptotrigona* spp. nas fases mais avançadas, como pupa e imago, possivelmente por apresentar diâmetro maior do que o das células naturais de cria da espécie. Supõe-se que o excesso de espaço tenha permitido maior movimentação das pupas, o que poderia ter comprometido sua estabilidade postural e o microambiente físico, interferindo no processo adequado de metamorfose e culminando em maior mortalidade e no surgimento de deformidades. Dessa forma, a interrupção da avaliação na fase de pré-pupa teve como objetivo evitar a superinterpretação de efeitos que poderiam ter sido causados por limitações do sistema de criação in vitro, e não pelos tratamentos testados.

7.3.1.1 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk)

Como os grupos controle negativo e absoluto, bem como os tratamentos com menores concentrações de Btk, não apresentaram aumento na mortalidade, os efeitos observados podem estar relacionados à exposição às doses mais altas do biopesticida, possivelmente devido às toxinas e metabólitos produzidos pela bactéria. Além disso, o tempo de sobrevivência larval foi significativamente reduzido nas concentrações mais altas de Btk Para *S. aff. depilis*, as maiores taxas de mortalidade foram observadas com Btk a concentração de 8×10^7 esporos viáveis/mL para *S. aff. depilis* e $9,4 \times 10^7$ e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL para *S. cf. postica* e no controle positivo com Tiametoxam.

Esses resultados indicam que o Btk, na maior concentração testada, comprometeu significativamente a sobrevivência dos imaturos em ambas as espécies. Da mesma forma, o controle positivo (Tiametoxam) também reduziu significativamente a sobrevivência larval. O tempo médio até atingir 50% de mortalidade, valor que corresponde à mediana, foi de aproximadamente 11 dias para o Btk e apenas 1 dia para o inseticida.

Resultados semelhantes foram relatados por Brighenti et al. (2007) onde relataram que *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (²Dipel® PM), sobre adultos de *A. mellifera* em solução aquosa de mel a 50%, não afetou significativamente a sobrevivência das abelhas nas menores doses testadas. Após 96 horas de exposição, às concentrações de 0,25 g/100 mL ($6,25 \times 10^7$

² Cálculos utilizados para determinar a concentração de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em cada tratamento descrito no estudo. Dados do produto e formulação: produto: Dipel® e forma: pó molhável (PM); concentração do pó: 32 g/kg; potência: 16.000 unidades internacionais de potência por mg; esporos viáveis: 25 bilhões por grama. Cálculo para uma das concentrações (por exemplo, 1,0 g em 100 mL): número de esporos em 1,0 g de pó: $1 \text{ g} \times 25 \times 10^9 \text{ esporos/mL} = 25 \times 10^9 \text{ esporos viáveis}$; concentração de esporos em 100 mL de suspensão: $25 \times 10^9 \text{ esporos viáveis} / 100 \text{ mL} = 2,5 \times 10^8 \text{ esporos viáveis/mL}$.

esporos/mL), 0,5 g/100 mL ($1,25 \times 10^8$ esporos viáveis/mL) e 1 g/100 mL ($2,5 \times 10^8$ esporos viáveis/mL) resultaram em taxas de mortalidade de 1,8%, 33,3% e 33,3%. Resultado semelhante foi observado com duas preparações de biopesticidas à base de Bt (Foray 48B e Dipel 2X) alimentadas às abelhas na menor concentração testada de 2,5 mg/g (Malone et al., 1999). Por outro lado, no estudo de Brighenti et al. (2007) nas concentrações mais elevadas reduziram significativamente a sobrevivência das abelhas. As doses de 10 g ($2,5 \times 10^9$ esporos viáveis/mL) e 20 g (5×10^9 esporos viáveis/mL) causaram mortalidade de 94,7% e 98,2%, respectivamente. Já as concentrações intermediárias, de 2,5 g ($6,25 \times 10^8$ esporos viáveis/mL) e 5 g ($1,25 \times 10^9$ esporos viáveis/mL), apresentaram CL_{50} , com taxas de mortalidade de 73,7% e 75,4%, provocando o intumescimento do abdômen de abelhas que ingeriram alimento contaminado com essa bactéria. Semelhante a estudo realizado por Malone et al. (1999) concentração extremamente alta de Dipel (10 mg/g) resultou em uma redução significativa no consumo de alimentos e na sobrevivência, embora não tenha sido esclarecido se isso foi devido à toxina Bt ou a alguns dos ingredientes "inativos" na preparação. Esses resultados demonstram que a sobrevivência de operárias adultas de *A. mellifera* foi impactada de forma dependente da concentração administrada. As concentrações testadas nesses estudos são comparáveis às avaliadas neste trabalho para imaturos de abelhas sem ferrão.

A segurança para a abelha melífera de formulações comerciais de biopesticidas Bt, desde que não contenham exotoxinas, está bem estabelecida (Cantwell et al., 1972; Celli, 1974; Buckner et al., 1975; Cantwell e Shieh, 1981; Vandenberg, 1990). Resultados semelhantes foram obtidos por Cantwell et al. (1966), que observaram mortalidade de quase 100% em *A. mellifera* após 7 dias quando expostas a 2,5 mg/abelha de exotoxina bruta liofilizada de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. No entanto, ao fornecer o produto comercial total na concentração de 6×10^7 esporos/abelha, a mortalidade não foi significativa ao longo 9 dias,

mas atingiu 100% com 11 dias de exposição. Por outro lado, Verma (1995), na Índia, em bioensaios de pulverização com Dipel® observou que a sobrevivência em larvas e adultos de *A. cerana* não foram afetadas, possivelmente a diferença de suscetibilidade ao biopesticida está entre a diferença de espécie.

A aplicação de Bt via pulverização sobre abelhas tende a ter pouco ou nenhum efeito, como demonstrado por Potrich et al. (2018) em bioensaios com *A. mellifera* e em estudo de campo realizado por Salord et al. (2014) onde indicou que aplicações aéreas de calda Bt não interferiram no desenvolvimento biológico das colônias de *A. mellifera*. No estudo de Potrich et al. (2018), operárias de *A. mellifera* africanizadas expostas ao biopesticida Btk HD-1 (S-1450), na concentração de $3,0 \times 10^8$ esporos/mL, em bioensaio de 240 horas, mantidas em caixas plásticas ventiladas com tecido *voile*, não apresentaram alterações na sobrevivência quando expostas por pulverização direta ou por contato com folhas de soja tratadas. No entanto, houve redução na sobrevivência das operárias quando o biopesticida foi aplicado sobre superfícies lisas ou incorporado à pasta de doce. Além disso, não foram observadas alterações morfométricas no intestino médio das abelhas. Entretanto, em estudo de Libardoni et al. (2018), em um bioensaio de pulverização de *B. thuringiensis* na concentração de 3×10^8 esporos. mL⁻¹ (dosagem comercial) sobre *A. mellifera*, constatou que apenas a linhagem Bt 1 (IPS 82) causou uma redução significativa na sobrevivência das abelhas, com uma média de 88,7 horas, em comparação ao grupo controle, que apresentou 104,72 horas de sobrevivência. Após 120 horas de análise, observou-se que as operárias tratadas com Bt 3 – BR 147 apresentaram uma sobrevivência de 51,67%, enquanto o tratamento com Bt 2 resultou em 43,34% de sobrevivência, sem diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (51,67% de sobrevivência). As operárias expostas à linhagem Bt 1 - IPS 82 apresentaram 100% de mortalidade em 96 horas, diferindo dos demais tratamentos. As linhagens como BR 147 em

teste de contato, e como a IPS 81 em teste de ingestão podem reduzir a sobrevivência das operárias de *A. mellifera* em bioensaios tanto de contato e pulverização quanto de ingestão. Esses resultados indicaram que as diferentes linhagens de *B. thuringiensis* variam em toxicidade, sugerindo que nem todas as formas deste biopesticida apresentam o mesmo nível de impacto sobre abelhas.

Cabezas e Farinós (2022) relataram que *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (³DiPel® DF WG, 54% p/p, cepa ABTS-351 (32 milhões de UFC/g), sobre operárias recém-emergidas de *Bombus terrestris* L. previamente diluído em 0,1% de *Triton*® X-100, depois em em xarope artificial *Api 65*®, não afetou significativamente a sobrevivência das operárias nas menores doses testadas. Após 48 horas de exposição, a faixa de concentrações utilizada no bioensaio preliminar variou entre 54 ppm ($1,728 \times 10^3$ UFC/mL) e 54.000 ppm ($1,728 \times 10^6$ UFC/mL). A mortalidade foi registrada apenas no grupo de operárias tratadas com a concentração mais elevada, de 54.000 ppm ($1,728 \times 10^6$ UFC/mL), quando houve redução significativa na sobrevivência das abelhas, com mortalidade de 73,7%. No estudo de Cantwell e Shieh (1981), o *B. thuringiensis* sorotipo 7 foi testado em diversas concentrações aplicadas a favos armazenados, sem causar impacto aparente na mortalidade de abelhas adultas, no desenvolvimento das crias ou na produção de mel. Segundo D'Urso et al. (2016) as análises produto comercial formulado à base de cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e/ ou *aizawai* sugeriram que, em um cenário natural mais realista, onde as abelhas são expostas a concentrações mais baixas e diluídas do biopesticida, as implicações para a mortalidade das

³ Os cálculos para determinar a concentração de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em cada tratamento do estudo foram realizados com base nas especificações do produto Dipel® (grânulos dispersíveis em água - WG). Este produto contém 54% de ingrediente ativo (54 g de *B. thuringiensis* por 100 g de produto) e possui uma potência de 32 milhões de UFC/g. Para calcular uma das concentrações, como por exemplo 54.000 ppm, utilizou-se 54 g do produto. $54\text{g} \times 32.000.000 \text{ UFC/g} = 1,728 \times 10^9 \text{ UFC}$. Essa quantidade foi então diluída em 1 litro (1000 mL), resultando em uma concentração final de $1,728 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$.

operárias adultas de *A. mellifera* podem ser insignificantes, apesar de algumas mudanças na morfoestrutura do intestino médio. No estudo de Alkassab et al. (2024) com abelhas operárias de inverno (*A. mellifera*) testadas em laboratório, foi observada uma redução na taxa de sobrevivência ao longo de 15 dias após a exposição crônica por 10 dias aos produtos comerciais: FlorBac® contendo *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* - Bta (estirpe: ABTS-1857) a concentração de 1×10^8 UFC/mL, enquanto nenhum efeito foi detectado no produto formulado Lepinox® Plus Btk (EG-2348) a concentração de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL. A exposição crônica resultou em níveis de mortalidade mais elevados em comparação com a exposição aguda. A formulação direcionada a lepidópteros, contendo Bta ABTS 1857, demonstrou aumento da mortalidade de adultos e larvas de abelhas após exposição crônica em condições de laboratório (Steinigeweg et al., 2021). Entretanto, em cenários mais realistas, as abelhas estarão expostas com mais frequência a concentrações subletais de pesticidas (Raine et al, 2024).

Entre os estudos que avaliam o risco de pesticidas para abelhas sociais e solitárias, as abelhas sociais representam o grupo mais estudado. No entanto, dentro desse grupo, há poucos trabalhos sobre os efeitos de biopesticidas à base de *Bacillus* spp. em abelhas da tribo Meliponini (abelhas-sem-ferrão) e do gênero *Bombus*. A maioria dos estudos concentra-se em abelhas do gênero *Apis*. Especificamente sobre os biopesticidas de *Bacillus*, as pesquisas existentes indicam que são poucos os trabalhos que avaliam os efeitos de cepas (ou linhagens) de *Bacillus*. Em contraste, a maioria dos estudos se concentra nas toxinas Bt isoladas.

Diversos estudos com *Apis mellifera* não identificaram efeitos significativos de toxinas Bt isoladas expressa em plantas transgênicas (Cappa et al., 2022), assim como estudos realizados por Sims (1995) com a toxina Cry1Ac, por Arpaia (1996) com a toxina Cry3B, por Malone et al. (1999) com a toxina Cry1Ba, por Malone (2001) com a toxina Cry1Ba, por Babendreier et al. (2005) com a toxina Cry1Ab, por Bailey et al. (2005) com a toxina Cry1Ab,

por Liu et al. (2005) com a toxina Cry1Ac, por Ramirez-Romero et al. (2005) com a toxina Cry1Ab, por Babendreier et al. (2007) com a toxina Cry1Ab, e por Rose et al. (2007) com a toxina Cry1Ab. Além desses estudos com *Apis mellifera*, diversos estudos com outras espécies do gênero *Apis* não identificaram efeitos significativos de toxinas Bt isoladas expressa em plantas transgênicas. Jia et al. (2017) com toxina Cry1Ie na microbiota intestinal de *Apis cerana cerana*, do mesmo modo que Dai et al. (2012) com a toxina Cry1Ah não afetou a sobrevivência, o desenvolvimento, o desempenho da colônia ou o comportamento de *Apis mellifera ligustica* e *A. cerana cerana*. Além disso, pesquisas de Dai et al. (2015) indicaram que a toxina Cry1Ah não representa risco para a sobrevivência e o desenvolvimento de operárias imaturas de *A. cerana cerana*. Hendriksma et al. (2013) avaliaram os efeitos das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry3Bb1 sobre abelhas nutrizes de *Apis mellifera carnica* e não observaram impactos na sobrevivência, no peso corporal ou nas taxas de digestão do pólen, nem alterações na microbiota intestinal. Han e Dai (2021) também não identificaram efeitos adversos da toxina Cry78Ba1 sobre a sobrevivência, o peso e a alimentação de larvas e adultos de *A. mellifera* após exposição oral nas concentrações testadas, assim como estudos realizados por Hanley et al. (2003) com a toxina Cry1Ab e Cry1F.

Uma revisão de Raymond e Wright (2009) analisou 27 estudos sobre diversas toxinas de *Bt*, não encontrando efeitos sobre as abelhas. Segundo Malone (2001) considera provável que as plantas transgênicas Bt também sejam inofensivas para as abelhas. O estudo de Lima et al. (2013) demonstrou que a ingestão da toxina Cry1Ac, mesmo em alta concentração na dieta larval, não teve efeitos tóxicos sobre a abelha sem ferrão *Trigona spinipes*, nem interferiu na sobrevivência ou no desenvolvimento de larvas e pupas operárias, sugerindo que essa toxina, expressa em pólen de plantas geneticamente modificadas, é improvável de causar danos em condições de campo. Da mesma forma, Babendreier et al. (2008) concluíram que a toxina Bt

Cry1Ab não afeta *Bombus terrestris*, indicando um risco insignificante para a saúde das colônias expostas, assim como estudos realizados por Morandim e Winston (2003) com a toxina Cry1Ac sobre *Bombus occidentalis* e *Bombus impatiens*. Em contraste, Seide et al. (2018) relataram, pela primeira vez, que as toxinas Cry1F e Cry2Aa podem comprometer o desenvolvimento da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* após a ingestão de alimento larval contendo essas toxinas. No caso das abelhas sem ferrão, as larvas são alimentadas de forma massal com grandes quantidades de pólen, misturado a néctar e secreções glandulares. Um contraste importante em relação às abelhas melíferas, que recebem uma alimentação parcial de geleia real durante o desenvolvimento (Roubik, 2023). Como resultado, as larvas de abelhas sem ferrão ingerem mais pólen e, em casos de contaminação, estão potencialmente mais expostas a pesticidas do que larvas de abelhas melíferas e operárias. Os efeitos tóxicos sobre larvas tendem a ser mais impactantes para a saúde da colônia do que para indivíduos forrageadores. Entretanto, estudos com larvas de abelhas sem ferrão, especialmente envolvendo biopesticidas, ainda são raros. Apesar de alguns resultados não significativos, as pesquisas existentes indicam que diferentes biopesticidas podem atrasar o desenvolvimento larval, aumentar a mortalidade e causar danos aos adultos (Lima, 2024).

De acordo com Cantwell et al. (1972), esporos e cristais de *B. thuringiensis* demonstraram toxicidade insignificante, sendo necessária uma quantidade excessiva de exotoxina para provocar danos em abelhas *A. mellifera*. Isso se confirma com esse estudo, que somente na concentração mais alta, acima da concentração real em campo, teve efeito. As concentrações mais baixas e a concentração de campo de cepa de Bt não provocaram danos significativos às abelhas.

As concentrações de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* utilizadas nos bioensaios foram baseadas na suspensão original do produto comercial, que apresenta concentrações de 8×10^8

e $9,4 \times 10^9$ esporos viáveis/mL. A partir dessa suspensão mãe, foram preparadas diluições correspondentes a 8×10^7 e $9,4 \times 10^8$ esporos viáveis/mL, que constituíram as concentrações mais altas testadas diretamente nas abelhas.

Essas concentrações foram adotadas para representar um cenário conservador de exposição, conforme preconizado na Fase 1 da Avaliação de Risco de Agrotóxicos (Cham et al., 2020; Manual ARA/IBAMA). Tal abordagem, o chamado “pior cenário possível”, visa superestimar a exposição das abelhas, desconsiderando fatores ambientais que atenuam a disponibilidade do agente tóxico, como degradação, diluição e dispersão em campo. Dessa forma, os resultados indicam que o risco potencial para as espécies avaliadas é baixo, especialmente quando considerados os processos ambientais que reduzem a exposição real.

Portanto, a exposição real no ambiente natural seria menor, e não se espera que cause o mesmo nível de mortalidade observado no laboratório. O uso de produtos à base de *B. thuringiensis* é amplamente aprovado, mas poucos estudos investigam a persistência dos esporos no ambiente. Em geral, esses produtos apresentam baixa persistência na folhagem, com meia-vida de algumas horas a dois dias sob condições de campo (Pinnock et al., 1971; Ignoffo e Garcia, 1978; Pedersen et al., 1995; Haddad et al., 2005), devido a fatores bióticos e abióticos, são degradados por diversos fatores como radiação UV, temperatura e umidade (Ignoffo et al., 1974; Dunkle e Shasha, 1988; Khorramvatan et al., 2014, Sansinenea et al., 2015). Para aumentar a estabilidade no campo, formulações com adjuvantes de proteção UV têm sido desenvolvidas (Maghsoudi e Jalali, 2017). O que pode aumentar seu tempo em campo. Estudos sugerem a necessidade de uma avaliação mais aprofundada dos efeitos a longo prazo e em cenários de exposição repetida, mesmo em condições de diluição ambiental do produto (D'Urso et al., 2016). Contudo, a possibilidade de toxicidade crônica, devido a exposições repetidas e bioacumulação, não pode ser ignorada. Estudo realizado por Ramirez-Romero et al. (2008)

relataram persistência ambiental prolongada de células/toxinas de *B. thuringiensis*, além de alterações no comportamento de forrageamento e aprendizado em abelhas expostas a essas toxinas. O crescente uso de Bt levanta preocupações sobre a exposição crônica de espécies não-alvo, como polinizadores. Estudos com *A. mellifera* exposta a cepa Bta ABTS 1857 durante a floração completa de colza (*Brassica napus*), com aplicações múltiplas a cada 6 dias, simulando as condições de campo, mostraram concentrações nas larvas variaram de indetectáveis até $2,99 \times 10^4$ UFC/g, e em algumas amostras não foram detectados esporos de Bt (Alkassab et al., 2022). Este nível ainda pode ser tolerável para larvas, uma vez que estavam vivas durante a amostragem. No entanto, testes laboratoriais indicam alta mortalidade larval em concentrações superiores a 10^4 UFC/larva (Steinigeweg et al., 2021). Esses resultados sugerem um risco potencial para larvas expostas a essas concentrações. Embora alguns autores considerem *B. thuringiensis* um inseticida biológico seletivo, causando mortalidade apenas em organismos-alvo, estudos indicam possíveis efeitos adversos sobre polinizadores.

É importante ponderar que as diferentes espécies de abelhas, diferentes linhagens de *B. thuringiensis* e concentrações variam em toxicidade e os métodos de aplicação podem influenciar significativamente os resultados observados. Portanto, os efeitos verificados em uma situação específica não devem ser generalizados sem considerar essas variáveis (Hopwood et al., 2012). Diante disso, mais pesquisas são necessárias para determinar níveis seguros de exposição de larvas tanto de abelhas sem ferrão, quanto de *Apis* e avaliar os riscos potenciais para os polinizadores.

7.3.1.2 *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba)

No presente estudo, a ingestão da cepa de *B. amyloliquefaciens* não resultou em uma mortalidade estatisticamente significativa para larvas de *S. aff. depilis*, mesmo na concentração

mais alta testada (2×10^7 esporos viáveis/mL). Esses resultados indicam que, na concentração recomendada para uso em campo, a presença dessa cepa em pólen ou néctar não compromete a sobrevivência larval dessa espécie, reforçando seu potencial como biopesticida viável em sistemas agrícolas. Até o momento, não há registros na literatura sobre a avaliação de risco de *B. amyloliquefaciens* em imaturos de abelhas sem ferrão para fins comparativos. Em estudos com adultos de *A. mellifera*, conduzidos por Sabo et al. (2020), houve demonstração que a exposição ao produto comercial Serenade® ASO, formulado com esporos de *B. amyloliquefaciens* QST 713 (anteriormente *B. subtilis*), a concentração de 4×10^7 UFC/ml de dieta por 10 dias, também não comprometeu a sobrevivência das abelhas nem alterou sua microbiota eubacteriana. No entanto, foram observadas reduções significativas em parâmetros humorais do sistema imunológico. Por outro lado, estudos laboratoriais apontam efeitos adversos do *B. amyloliquefaciens* sobre abelhas. Alkassab et al. (2024), ao exporem operárias de inverno de *Apis mellifera* a uma exposição crônica de 10 dias ao produto comercial Serenade® ASO, na concentração de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL), observaram redução na taxa de sobrevivência ao longo de 15 dias. De forma semelhante, Mommaerts et al. (2009) relataram efeitos letais e subletais do Serenade® em *Bombus terrestris*, quando aplicado na concentração máxima recomendada para uso em campo. A exposição dérmica causou 88% de mortalidade, enquanto a ingestão via néctar açucarado levou à mortalidade total (100%). Além disso, houve redução significativa na produção de zangões. Com base nesses achados, os autores recomendam a realização de testes mais realistas em condições de campo para avaliar melhor os impactos desse biopesticida sobre polinizadores (Raine et al, 2024). Ramanaidu e Cutler (2013) avaliaram os impactos da exposição oral e tópica ao *B. amyloliquefaciens* QST 713 em *B. impatiens* ao longo de 60 dias. A exposição oral reduziu a produção de zangões e acelerou a oviposição e emergência destes. Por outro lado, aplicações tópicas em doses mais baixas do que as recomendadas resultaram em efeito hormético, aumentando a produção de zangões.

Embora *B. amyloliquefaciens* seja amplamente reconhecido por sua eficácia no controle de doenças fúngicas em plantas e pela produção de diversos antibióticos e metabólitos, alguns desses compostos apresentam propriedades adicionais. Entre esses compostos, a surfactina e a iturina foram relatadas por apresentarem atividade inseticida e efeitos inibidores da alimentação em insetos (Assié et al., 2002; Geetha e Manonmani, 2010; Blibech et al., 2012). Em uma revisão da literatura mostrou que, além da toxicidade direta, diferentes classes de biopesticidas podem causar uma variedade de efeitos subletais em polinizadores (Cappa et al., 2022), o que destaca a importância de aprofundar as investigações sobre possíveis os impactos subletais, tanto no nível individual quanto no de colônia, para compreender melhor a resposta das abelhas e os riscos em condições de campo. O risco de biocontroladores contendo *B. amyloliquefaciens* para abelhas não pode ser excluído, pois a aplicação pode potencialmente resultar na sua exposição, seja através de meios diretos, pulverização excessiva ou por contato com “esporos” nas plantas, enquanto as abelhas estão procurando comida. Esses resultados destacam que os efeitos dos biopesticidas podem variar dependendo da via de exposição e da concentração utilizada, enfatizando a necessidade de avaliações detalhadas para entender plenamente os riscos e benefícios associados ao uso desses agentes de controle biológico.

Estudos sobre o impacto de inseticidas em abelhas mostraram efeitos variados, afetando diferentes espécies de maneiras distintas (Goulson, 2013; Lourencetti et al., 2023). As abelhas sem ferrão testadas por Lourencetti et al. (2023) demonstraram maior sensibilidade ao inseticida em comparação com *A. mellifera*, organismo modelo utilizado em testes ecotoxicológicos, além de apresentarem sensibilidades distintas entre as espécies de abelhas sem ferrão.

Pesquisas que investigam o efeito de biopesticidas microbianos na saúde das abelhas ainda estão em desenvolvimento (Borges et al., 2021; Erler et al., 2022), particularmente sua interação com o microbioma intestinal (Steinigeweg et al., 2023). Sugere-se que seja realizado

estudos com combinações microbianas para avaliar a sobrevivência das abelhas em condições de laboratório, semi-campo e campo (Alkassab et al., 2024). e os possíveis efeitos das combinações de biopesticidas em imaturos e adultos de abelhas sem ferrão, solitárias e abelhas do gênero *Apis*.

Essas considerações reforçam a complexidade das interações entre biopesticidas e abelhas, sublinhando a importância de mais estudos para garantir a segurança ecológica desses produtos, especialmente em sistemas agrícolas onde a polinização desempenha um papel crucial.

7.3.2 Tempo médio do ciclo de vida

Para *Scaptotrigona cf. postica*, foi possível realizar essa análise de forma controlada, com acompanhamento individualizado do desenvolvimento. Os dados indicaram que a exposição ao Btk, nas concentrações testadas, não alterou significativamente a duração média dos estágios larval e pré-pupal quando comparada aos controles negativo (alimento larval puro) e absoluto (alimento larval com adição de água destilada). Esses resultados sugerem que, embora o Btk tenha causado mortalidade em concentrações mais elevadas, não houve impacto substancial sobre a taxa de desenvolvimento dos indivíduos sobreviventes.

Até o momento, não foram encontrados estudos com cepas comerciais de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* avaliando seus efeitos sobre o desenvolvimento de estágios imaturos de abelhas sem ferrão, o que limita comparações diretas. No entanto, resultados semelhantes foram relatados por Lima et al. (2013) em estudos com *Trigona spinipes*, nos quais a exposição à proteína isolada, purificada e ativada de Btk também não resultou em alterações significativas na duração dos estágios larval e pupal. Ainda que alguns estudos não tenham observado efeitos significativos, há evidências na literatura de que determinados biopesticidas podem interferir

no tempo de desenvolvimento das abelhas. Por exemplo, Lima (2024) identificou atrasos no desenvolvimento larval relacionados à exposição a diferentes produtos biológicos. De forma semelhante, Seide et al. (2018) demonstraram que a ingestão das toxinas Cry1F e Cry2Aa alterou o desenvolvimento de *Melipona quadrifasciata* após a contaminação do alimento larval.

Embora o presente estudo tenha utilizado uma formulação comercial contendo a cepa de Btk, a ausência de efeitos sobre o tempo de desenvolvimento observada neste trabalho e na literatura com proteína purificada sugere que, sob determinadas condições de exposição e concentração, o Btk pode não interferir significativamente no desenvolvimento ontogenético de abelhas sem ferrão. Ainda que o Btk tenha ação específica sobre larvas de Lepidoptera, seus efeitos sobre organismos não alvo, como as abelhas nativas, podem variar conforme a susceptibilidade da espécie, a via de exposição e a concentração utilizada.

A ausência de alterações na duração dos estágios imaturos reforça a hipótese de que os indivíduos de *S. cf. postica*, nas concentrações avaliadas, não apresentaram respostas subletais perceptíveis ao Btk em termos de desenvolvimento. No entanto, ressalta-se a importância da realização de estudos adicionais em condições controladas, com monitoramento até a fase de emergência, para uma caracterização mais abrangente e precisa do risco ecotoxicológico associado ao uso de biopesticidas na agricultura.

8. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a segurança do *B. amyloliquefaciens* como biopesticida no controle de pragas, evidenciando que esta cepa não representa riscos toxicológicos significativos para as larvas de abelhas sem ferrão (*S. spp.*), tornando-se uma alternativa viável e segura para sistemas agrícolas. Por outro lado, embora o *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tenha mostrado potencial tóxico em altas concentrações no laboratório, os riscos em campo são significativamente reduzidos devido à diluição dos produtos e à menor exposição das abelhas, sugerindo que efeitos adversos significativos nas abelhas sem ferrão são improváveis nas condições agrícolas típicas. Esses resultados são importantes para a avaliação de risco ambiental e para o desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de pragas que minimizem os impactos sobre os polinizadores não-alvo, como as abelhas.

É necessário aprofundar as investigações, especialmente em relação aos efeitos de longo prazo desses biopesticidas. A análise dos impactos subletais, o estudo do ciclo de desenvolvimento das abelhas até a emergência, além de investigações morfológicas e citológicas são fundamentais para uma compreensão mais completa dos riscos envolvidos. Ademais, recomenda-se realizar estudos que avaliem o impacto das combinações de biopesticidas em imaturos e adultos de abelhas sem ferrão, solitárias e do gênero *Apis*, tanto em condições de laboratório quanto em semi-campo e campo. Esses estudos, ao simular de maneira mais realista as condições de exposição, fornecerão dados mais robustos e precisos, essenciais para assegurar que as práticas de controle biológico adotadas sejam seguras, eficazes e sustentáveis, preservando os polinizadores que desempenham um papel vital na manutenção da biodiversidade e da produção agrícola.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, Luciana de Paiva Santos et al. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 16, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18316/rca.v16i1.8339>.
- AGAISSE, Hervé; LERECLUS, Didier. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995. DOI: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>.
- ALBUQUERQUE, Ana Christina Sagebin; DA SILVA, Aliomar Gabriel. **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008., 2008. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/45532877.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2025.
- ALKASSAB, Abdulrahim T. et al. Determination, distribution, and environmental fate of *Bacillus thuringiensis* spores in various honeybee matrices after field application as plant protection product. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 25995-26001, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19414-5>.
- ALKASSAB, Abdulrahim T. et al. Exposure of honey bees to mixtures of microbial biopesticides and their effects on bee survival under laboratory conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 18, p. 26618-26627, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32753-9>.
- ALVES, Sérgio Batista e LOPES, Rogério Biaggioni. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ. 2008.
- ANDREWS, Robert E. et al. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. **Critical reviews in biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 163-232, 1987. <https://doi.org/10.3109/07388558709113596>
- ANGELO, Elisangela Andrade; VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade; CASTRO-GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744098014.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2025.
- ARAUJO AVILA, Giovani Mansani et al. Use of efficient microorganisms in agriculture. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e40610817515-e40610817515, 2021.
- ARENA, Maria; SGOLASTRA, Fabio. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, 2014, 23: 324-334. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>.
- ARPAIA, S. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. 1996. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19981611051
- ASSIÉ, Lazar et al. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). **Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en**

Toegepaste Biologische Wetenschappen, v. 67, n. 3, 2002. Disponível em: <https://hdl.handle.net/2268/4444>. Acesso em: 06 mar. 2025.

AZEVEDO, João Lúcio et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of biotechnology**, Valparaíso, Chile v. 3, n. 1, p. 15-16. 2000.

BABENDREIER, Dirk et al. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 585-594, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2005049>.

BABENDREIER, Dirk et al. Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee microcolonies. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 126, n. 2, p. 148-157, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00652.x>

BABENDREIER, Dirk et al. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. **FEMS microbiology ecology**, v. 59, n. 3, p. 600-610, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x>.

BABIN, Aurélie et al. Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 16241, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73145-6>.

BAILEY, Janisse et al. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 623-633, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2005048>.

BAKKER, Peter AHM et al. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2, 4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 617-624, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020526126283>.

BARBOSA, Deise Barbosa et al. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694-703, 2017.

BARBOSA, L. R. et al. Controle biológico no MIP florestal. **Novo manual de pragas florestais brasileiras**. 2021.

BASS, Chris et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 121, p. 78-87, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>.

BEIG, Darwin. The production of males in queenright colonies of *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica*. **Journal of Apicultural Research**, v. 11, n. 1, p. 33-39, 1972. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1972.11099697>.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>.

BERNAL, J., et al. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **Journal of economic entomology**, 2010, 103.6: 1964-1971. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC10235>.

BIESMEIJER, Jacobus C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1127863>.

BLACQUIERE, Tjeerd et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973-992, 2012. DOI 10.1007/s10646-012-0863-x.

BLIBECH, Imen et al. Isolation of entomopathogenic *Bacillus* from a biodynamic olive farm and their pathogenicity to lepidopteran and coleopteran insect pests. **Crop Protection**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.09.020>.

BOOTTANUN, Patcharaporn et al. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. **AMB express**, v. 7, p. 1-11, 2017.

BORGES, Shannon et al. Overview of the testing and assessment of effects of microbial pesticides on bees: strengths, challenges and perspectives. **Apidologie**, p. 1-22, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00900-7>.

BOYLE, Natalie K. et al. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/nvy103>.

BPBESREBIPP. Relatório temático sobre polinização. M. Wolowski, K. Agostini, A.R. Rech, I.G. Varassin, M. Maués, L. Freitas, L.T. Carneiro, R.O. Bueno, H. Consolaro, L. Carvalheiro, A.M. Saraiva, C.I. Silva, M.C.G. Padgurschi (Eds.), Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.

BPBES-REBIPP. Material Suplementar sobre o “Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimento no Brasil”. **Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos – BPBES**, p. 1-2, 2019. Disponível em: <https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2022/04/FINAL-COMPLEMENTOS-Release-Lancamento-Polinizacao-EMBARGO-6fev2019.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2025.

BRAR, Satinder K. et al. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.toxicon.2006.11.022>.

BRAVO, Alejandra et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.ibmb.2011.02.006>.

BRIGHENTI, Deodoro Magno et al. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 279-289, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200003>.

BROSI, Berry J.; BRIGGS, Heather M. Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. 13044-13048, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307438110>.

BUCKNER, C. H.; GOCHNAUER, T. A.; MCLEOD, B. B. The impact of aerial spraying of insecticides on bees. 1975. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19790209075.

BUSCHINI, M. L. T.; CAMPOS, LA de O. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera; Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. 1996.

BUTU, Marian; RODINO, Steliana; BUTU, Alina. Biopesticide formulations-current challenges and future perspectives. In: **Biopesticides**. Woodhead Publishing, 2022. p. 19-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00010-9>.

CABEZAS, Guillermo; FARINÓS, Gema P. Sensitivity of buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris* L.) to insecticides with different mode of action. **Insects**, v. 13, n. 2, p. 184, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13020184>.

CAMARGO, CA de. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 32, n. 1, p. 133, 1972. DOI: https://digitalcommons.usu.edu/bee_lab_bu/90

CANTWELL, George E. et al. Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies treated with certain biological insecticides. **Journal of invertebrate pathology**, v. 8, n. 2, p. 228-233, 1966. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(66\)90133-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(66)90133-9).

CANTWELL, G. E.; LEHNERT, T.; FOWLER, J. Are biological insecticides harmful to the honey bee?. **American Bee Journal**, Vol. 112, 255-258; 294-296, 1972. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19740201574

CANTWELL, G. E.; SHIEH, T. R. Certan-a new bacterial insecticide against the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. **American Bee Journal**, Vol. 121, No. 6, 424-426, 430-431. 1981. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19820212756

CAPALBO, Deise MF, et al. Aplicação da engenharia a processos biotecnológicos: O caso dos biopesticidas. **Cobenge**. 2001.

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

CAPPA, Federico; BARACCHI, David; CERVO, Rita. Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. **Science of the Total Environment**, v. 837, p. 155714, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155714>.

CASTILHOS, Dayson et al. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, p. 263-272, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>.

CELLI, G. Conditions for the survival of the honeybee in present agricultural systems. 1974. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19770205454.

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C. F.; BORGES, L. O.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHTEIN, B.; FREITAS, B. M.; PIRES, C. S. S.; OLIVEIRA, F. F.; CONTRERA, F. A. L.; TOREZANI, K. R. S.; RIBEIRO, M. F.; SIQUEIRA, M. A. L.; ROCHA, M. C. L. S. A. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>.

CHAM, K. de O. et al. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. **Brasília: Ibama/Diqua**, v. 105, 2017.

CHANG, Xiaojiao et al. Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 4, p. 564-571, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.991948>.

CHAVANA, Joshua; JOSHI, Neelendra K. Toxicity and risk of biopesticides to insect pollinators in urban and agricultural landscapes. **Agrochemicals**, v. 3, n. 1, p. 70-93, 2024.

CHEN, Xiao Hua et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1007-1014, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1325>.

CHESTUKHINA, G. G. et al. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. **Archives of Microbiology**, v. 132, p. 159-162, 1982.

CLARK, Taane G. et al. Survival analysis part I: basic concepts and first analyses. **British journal of cancer**, v. 89, n. 2, p. 232-238, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601118>.

COSTANZA, Robert et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **nature**, v. 387, n. 6630, p. 253-260, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1038/387253a0>.

COYLE, David R. et al. Laboratory and field evaluations of two *Bacillus thuringiensis* formulations, Novodor and Raven, for control of cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 713-720, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.713>.

CRESSWELL, James E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 149-157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0566-0>.

CROPLIFE BRASIL. Mercado de Biológicos: Cenário Atual e Perspectivas. **CropLife Brasil: Mídia**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org>. Acesso em: 11 jul. 2023

CROPLIFE BRASIL. Protagonismo brasileiro na adoção de bioinsumos insere o país nas discussões em torno das agendas climática e verde global, Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/protagonismo-brasileiro-na-adocao-de-bioinsumos-insere-o-pais-nas-discussoes-em-torno-das-agendas-climatica-e-verde-global/>. **CropLife Brasil: Mídia**. Acesso em: 07 mar. 2024.

CRUZ, Ivan. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. 1995. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/15437047.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2025.

DAI, Ping-Li et al. The effects of Bt Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). **Apidologie**, v. 43, p. 384-391, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC10235>.

DAI, Ping-Li et al. Effects of Bt cry1Ah corn pollen on immature worker survival and development of *Apis cerana cerana*. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 1, p. 72-76, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1035075>.

DAI, Ping-Li et al. Field assessment of Bt cry1Ah corn pollen on the survival, development and behavior of *Apis mellifera ligustica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 232-237, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.005>.

DAVID, Thomas I.; Storkey, Jonathan; Stevens, Carly J. Understanding how changing soil nitrogen affects plant-pollinator interactions. **Arthropod-Plant Interact**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11829-019-09714-y>

DELKASH-ROUDSARI, Sahar et al. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111108, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111108>.

DELUCCA II, Anthony J.; SIMONSON, Janet G.; LARSON, A. D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 865-870, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1139/m81-137>

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363-IN2, 1971.

DESNEUX, Nicolas; DECOURTYE, Axel; DELPUECH, Jean-Marie. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, n. 1, p. 81-106, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>.

DO CARMO ZERBO, Aparecida et al. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidia, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 1, p. 139-147, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00324-4](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00324-4).

DUDLEY, Nigel; ALEXANDER, Sasha. Agriculture and biodiversity: a review. **Biodiversity**, v. 18, n. 2-3, p. 45-49, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/14888386.2017.1351892>.

DUNKLE, R. L.; SHASHA, B. S. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. **Environmental Entomology**, v. 17, n. 1, p. 120-126, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/17.1.120>.

D'URSO, Vera et al. Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea) under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. **Apidologie**, v. 48, p. 51-62, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0448-4>.

EERAERTS, Maxime et al. Nesting material, phenology and landscape complexity influence nesting success and parasite infestation of a trap nesting bee. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 332, p. 107951, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.107951>.

ENGELS, Wolf; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: **Social insects: an evolutionary approach to castes and reproduction**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. p. 167-230. DOI: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-74490-7_9?pdf=chapter%20toc.

ERLER, Silvio et al. Impact of microorganisms and entomopathogenic nematodes used for plant protection on solitary and social bee pollinators: Host range, specificity, pathogenicity, toxicity, and effects of experimental parameters. **Environmental Pollution**, v. 302, p. 119051, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119051>.

FAITA, Marcia Regina; CHAVES, Adriana; NODARI, Rubens Onofre. A expansão do agronegócio: impactos nefastos do desmatamento, agrotóxicos e transgênicos nas abelhas. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. UFPR, v. 57, p. 70-105, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5380/dma.v57i0.76157>.

FREITAS, Breno Magalhães; PINHEIRO, José Nunes. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia australis**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4257/OECO.2010.1401.17>.

FRITZE, Dagmar. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245-1248, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. **J. Agr. Chem. Soc. Japan**, v. 19, p. 487-503, 1943.

GALLAI, Nicola, et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological economics**, 2009, 68.3: 810-821. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.

GALZER, Elisângela; AZEVEDO FILHO, Wilson. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.

GAŠIĆ, Slavica M.; TANOVIĆ, Brankica. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. **Pesticides and Phytomedicine/Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 2, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2298/PIF1302097G>.

GEETHA, I.; MANONMANI, A. M. Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 4, p. 406-412, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02912.x>.

GIANNINI, Tereza Cristina et al. Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182274, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182274>.

GLARE, Travis et al. Have biopesticides come of age?. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250-258, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>.

GLARE, Travis R. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley & Sons**, p. 350, 2000. DOI: [1572543024157404160](https://doi.org/10.1002/9781118133333.ch16).

GONZÁLEZ-VARO, Juan P. et al. Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 9, p. 524-530, 2013. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008](https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008).

GORDON, Ruth Evelyn; HAYNES, William C.; PANG, C. Hor-Nay. **The genus *bacillus***. Agricultural research service, US Department of Agriculture, 1973.

GOULSON, Dave. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977-987, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>.

GRÜTER, Christoph. **Stingless bees: their behaviour, ecology and evolution**. Springer Nature, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-60090-7>.

HADDAD, Marinéia de Lara et al. Field persistence of *Bacillus thuringiensis* on maize leaves (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 309-314, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400001>.

HAN, Bo et al. Effects of Bt Cry78Ba1 toxin on larvae and adults of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 1, p. 403-408, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/toaa261>.

HANLEY, Anne V.; HUANG, Zachary Y.; PETT, Walter L. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 4, p. 77-81, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2003.11101097>.

HANNAY, C. L.; FITZ-JAMES, P. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 694-710, 1955. DOI: <https://doi.org/10.1139/m55-083>.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Sociaux**, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02225876>.

HENDRIKSMA, Harmen P. et al. Effect of stacked insecticidal Cry proteins from maize pollen on nurse bees (*Apis mellifera carnica*) and their gut bacteria. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e59589, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059589>.

HOPWOOD, Jennifer et al. Are neonicotinoids killing bees. **A review of research into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action**. Xerces Society for Invertebrate Conservation, USA, 2012.

IPBES. Summary for policymakers of 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, H. T. Ngo, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V. Dicks, L. A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A. J. Vanbergen, M. A. Aizen, S. A. Cunningham, C. Eardley, B. M. Freitas, N. Gallai, P. G. Kevan, A. Kovács-Hostyánszki, P. K. Kwapong, J. Li, X. Li, D. J. Martins, G. Nates-Parra, J. S. Pettis, R. Rader, and B. F. Viana (eds.). **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn, Germany. 36 pages, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3402857>.

IGNOFFO, Carlo M.; GARCIA, Clemente. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. **Environmental Entomology**, v. 7, n. 2, p. 270-272, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/7.2.270>.

IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. **Environmental Entomology**, v. 3, n. 1, p. 117-119, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/3.1.117>.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lúcia; KLEINERT, A. de MP. Worker reproduction in the stingless bee species *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Entomol. General**. 23(3): 169-175. 1998. DOI: <https://doi.org/10.5555/19990502923>.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; SARAIVA, Antonio Mauro; DE JONG, David. Bees as pollinators in Brazil. **Ribeirão Preto, Holos Editora**, 2006. Disponível em: https://www.conservation.org/docs/default-source/brasil/bees_pollinators.pdf. Acesso em: 16 abr. 2025.

JIA, Hui-Ru et al. No effect of Bt Cry1Ie toxin on bacterial diversity in the midgut of the Chinese honey bees, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera, Apidae). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41688, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep41688>.

KRAHNER, André et al. Review of approaches to the pesticide regulatory risk assessment for bees and other pollinators. **Berichte aus dem Julius Kühn-Institut**, n. 219, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5073/20220128-114629>.

KERR, Warwick Estevam. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 5, p. 181-276, 1948. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0071-12761948000100005>.

KERR, Warwick E.; LAIDLAW JR, Harry H. General genetics of bees. **Advances in genetics**, v. 8, p. 109-153, 1956. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60501-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60501-5)

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual review of entomology**, v. 28, n. 1, p. 407-453, 1983. DOI: [10.1146/annurev.en.28.010183.002203](https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.002203).

KHORRAMVATAN, Soodeh et al. The effect of polymers on the stability of microencapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt-KD2) after exposure to ultra violet radiation. **Biocontrol science and technology**, v. 24, n. 4, p. 462-472, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.871503>.

KLEIN, Alexandra-Maria et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.

KLEIN, A. M., et al. Insect Pollination of Crops in Brazil: A Guide for Farmers, Gardeners, Politicians and Conservationists. **Albert-Ludwigs University Freiburg**, Freiburg, 2020, 149. DOI: <https://doi.org/10.6094/UNIFR/151200>.

KOEDAM, Dick et al. The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*. **Physiological Entomology**, v. 26, n. 3, p. 254-259, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00241.x>.

KÖHL, Jürgen et al. Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. **BioControl**, v. 64, p. 469-487, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-019-09964-y>.

KUMAR, Vinod; KUMAR, Piyush. Pesticides in agriculture and environment: Impacts on human health. **Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation**, v. 1, p. 76-95, 2019. DOI: [10.26832/AESA-2019-CAE-0160-07](https://doi.org/10.26832/AESA-2019-CAE-0160-07).

KUMAR, Jitendra et al. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1185, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10061185>.

KUMAR, Pradeep et al. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 95, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3>.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.

LAIDLAW, H. H. Production of queens and package bees. In: GRAHAM, Joe M. (Ed.). **The hive and the honey bee**. Dadant & Sons, Hamilton, IL, USA. pp. 989-1041, 1992.

LIBARDONI, Gabriela et al. Effect of different *Bacillus thuringiensis* strains on the longevity of Africanized honey bee. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 329-337, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p329>

LIBARDONI, Gabriela et al. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3482, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82874-1>.

LICHTENBERG, E. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lúcia; NIEH, James Charles. Behavioral suites mediate group-level foraging dynamics in communities of tropical stingless bees. **Insectes sociaux**, v. 57, p. 105-113, 2010.

LIMA, Maria Augusta P. et al. Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Apidologie**, v. 44, p. 21-28, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0151-z>.

LIMA, Maria Augusta Pereira et al. Non-target effects of biopesticides on stingless bees (Apidae, Meliponini): recent trends and insights. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, p. 100580, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2024.100580>.

LINDAUER, M.; KERR, Warwick E. Communication between the workers of stingless bees. **Bee world**, v. 41, n. 2, p. 29-41, 1960. DOI: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1960.11095309>.

LIU, Yunpeng et al. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 4, p. 324-330, 2016.

LIU, Biao et al. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, p. 3487-3496, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-004-0824-7>.

LOURENCETTI, Ana Paula Salomé et al. Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, p. 120842, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>.

MAGHSOUDI, Shahab; JALALI, Elham. Noble UV protective agent for *Bacillus thuringiensis* based on a combination of graphene oxide and olive oil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11019, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11080-9>.

MAHMOOD, Isra et al. Effects of pesticides on environment. **Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science**, p. 253-269, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13.

MALASPINA, O; Nocelli, R.C.F. ; ROSA, A. S. ; DORIGO, A. S. ; MIOTELO, L. ; TAVARES, DA . Pode uma espécie exótica representar a biodiversidade de abelhas sociais brasileiras nas avaliações de risco a agrotóxicos?. In: Ana Lúcia Delgado Assad; Kátia Paula Aleixo. (Org.). **A Ciência das Abelhas - Pesquisa e desenvolvimento sobre polinizadores e polinização**. 1ed.São Paulo: A.B.E.L.H.A., 2024, v. 1, p. 1-197.

MALONE, Louise Anne; BURGESS, Elisabeth Phyllis June; STEFANOVIC, Dragana. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. **Apidologie**, v. 30, n. 6, p. 465-473, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19990601>.

MALONE, Louise A. et al. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. **Apidologie**, v. 32, n. 1, p. 57-68, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2001111>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Conceitos: Base conceitual do Programa Nacional de Bioinsumos. **MAPA**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso em: 10 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT: Consulta Aberta. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!crialov_ingredientes_ativos - **AGROFIT: Consulta Aberta**. Acesso em: 06 set. 2024.

MATYJASZCZYK, Ewa. “Biorationals” in integrated pest management strategies. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 6, p. 523-527, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0180-6>.

MAZARO, S. M. et al. Desafios na adoção de bioinsumos. Bioinsumos na cultura da soja. Embrapa, Brasília, DF, 2022.

MEMMOTT, Jane et al. Global warming and the disruption of plant–pollinator interactions. **Ecology letters**, v. 10, n. 8, p. 710-717, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01061.x>.

MENEZES, Cristiano; VOLLET-NETO, Ayrton; FONSECA, Vera Lucia Imperatriz. An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. **Apidologie**, v. 44, p. 491-500, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0197-6>.

MICHENER, Charles D. **The bees of the world**. JHU press, 2007.

MICHENER, Charles Duncan. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Harvard University Press, 1974.

MICHENER, Charles D. The professional development of an entomologist. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, n. 1, p. 1-15, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091404>.

MICHENER, C.D. The meliponini. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. (Eds VIT et al.,) 3-18. Springer Science & Business Media, 2013. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>.

MISHRA, Jitendra; DUTTA, Venkatesh; ARORA, Naveen Kumar. Biopesticides in India: technology and sustainability linkages. **3 Biotech**, v. 10, n. 5, p. 210, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02192-7>.

MOMMAERTS, Veerle et al. A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 65, n. 9, p. 949-955, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1778>.

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 47 p. - **Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 369. 2020.

MONTALVÃO, Sandro CL et al. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* With *Bacillus* spp. Strains. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 9, p. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v13n9p1>.

MORANDIN, Lora A.; WINSTON, Mark L. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. **Environmental Entomology**, v. 32, n. 3, p. 555-563, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.3.555>.

NAWROT-ESPOSITO, Marie-Paule et al. *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides induce developmental defects in non-target *Drosophila melanogaster* larvae. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 697, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11100697>.

NOCELLI, Roberta CF et al. (2012) As abelhas e os defensivos agrícolas. In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Alves DA, Saraiva AM (eds) **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**, 1st edn. São Paulo, SP, pp 257–272.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In: **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1997. p. 446-446. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1073141>. Acesso em: 22 fev. 2025.

NOGUEIRA NETO, Paulo. A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). 1970.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: **OECD Publishing**, 1998a. <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: **OECD Publishing**, 1998b. <https://doi.org/10.1787/9789264070189-en>

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 237: Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: **OECD Publishing**, 2013. <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 245: Honey Bee (*Apis mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding).

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: **OECD Publishing**, 2017. <https://doi.org/10.1787/9789264284081-en>

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure. OECD Series on Testing and Assessment, No. 239. Paris: **OECD Publishing**, 2021. <https://doi.org/10.1787/af108c61-en>

PAGE JR, Robert E.; PENG, Christine Y.-S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9).

PALMA, Leopoldo et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>.

PALMER, Mary J. et al. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1634, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms2648>.

PEDERSEN, Jens Christian et al. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 118-125, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1139/m95-016>.

PEREIRA, Micaela Benigna, et al. Análise do Ecossistema Caatinga Nativa no Município de Aparecida no Vale do Piranha Paraibano. **Cadernos de Agroecologia [Volumes 1 (2006) a 12 (2017)]**, 2015, 10.3.

PEREIRA, Elizangela Souza; CALDEIRA, Zaira Vieira; SOARES, Marcus Alvarenga. Manejo integrado de pragas na eucaliptocultura: inseticidas e parasitoides são compatíveis?. **Agri-Environmental Sciences**, 2016, 2.2: 1-13.

PINNOCK, Dudley E.; BRAND, Richard J.; MILSTEAD, James E. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, n. 3, p. 405-411, 1971. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90046-2).

PIRES, Carmen Silvia et al. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.51, n.5, p. 422-442, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>.

PIRES, Carmen S. S. et al. Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos. Brasília: Ibama, 2018. 84 p. Disponível em: <http://ibama.gov.br/component/phocadownload/file/4667-selecao-de-especies-de-abelhas-nativas-para-avaliacao-de-risco-de-agrotoxicos>. Acesso em: 3 mar. 2022.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia Uruguay**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2003. DOI: <https://doi.org/10.31285/AGRO.07.1043>.

POTRICH, Michele et al. Effect of entomopathogens on africanized *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, p. 23-28, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.12.002>.

POTTS, Simon G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

POTTS, Simon G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20588>.

PRABHA, Shashi et al. Biopesticides—An alternative and eco-friendly source for the control of pests in agricultural crops. **Plant Arch**, v. 16, n. 2, p. 902-906, 2016. Disponível em: <https://www.plantarchives.org/PDF%20162/902-906.pdf>. Acesso em: 18 de mar. 2025.

PRIEST, F. G. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 37, n. 1, p. 69-71, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>.

PROCTOR, Michael; YEO, Peter; LACK, Andrew. **The natural history of pollination**. 1996.

QUARLES, William. New biopesticides for IPM and organic production. *IPM Pract*, v. 33, p. 1-20, 2013.

RAINE, Nigel E.; RUNDLÖF, Maj. Pesticide exposure and effects on non-Apis bees. **Annual review of entomology**, v. 69, n. 1, p. 551-576, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-040323-020625>.

RAMANAIDU, Krilen; CUTLER, G. Christopher. Different toxic and hormetic responses of *Bombus impatiens* to *Beauveria bassiana*, *Bacillus subtilis* and spirotetramat. **Pest management science**, v. 69, n. 8, p. 949-954, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3456>.

RAMIREZ-ROMERO, Ricardo et al. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae)?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 327-333, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.002>.

RAMIREZ-ROMERO, Ricardo; CHAUFAX, Josette; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 601-611, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2005039>.

R DEVELOPMENT, Core Team. R: A language and environment for statistical computing, version 4.2. 2. 2022.

RAYMOND, Ben et al. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. e1000905, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000905>.

RECH, André Rodrigo et al. **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, 2014.

REDMOND, Carl T. et al. Strengths and limitations of *Bacillus thuringiensis galleriae* for managing Japanese beetle (*Popillia japonica*) adults and grubs with caveats for cross-order activity to monarch butterfly (*Danaus plexippus*) larvae. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 472-479, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5532>.

ROSA-FONTANA, Annelise et al. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114849, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114849>.

ROSA, Annelise de Souza et al. O consumo do neonicotinóide tiametoxam durante a fase larval interfere no desenvolvimento da espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *depilis*?. **FFCLRP - Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia**, p. 46, 2014.

ROSE, Robyn; DVELY, Galen P.; PETTIS, Jeff. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. **Apidologie**, v. 38, n. 4, p. 368-377, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2007022>.

ROUBIK, David W. Stingless bee (Apidae: Apinae: Meliponini) ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 68, n. 1, p. 231-256, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-103938>.

RUCKER, Randal R.; THURMAN, Walter N. Colony collapse disorder: the market response to bee disease. **PERC Policy Series**, 2012.

SABO, Rastislav et al. Sublethal effects of commercial plant protection product containing spores *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 (formerly *subtilis*) on winter adult honeybees. **Apidologie**, v. 51, p. 226-239, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00705-9>.

SALORD, Maria del Mar Leza et al. First field assessment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial application on the colony performance of *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae). **Spanish journal of agricultural research**, v. 12, n. 2, p. 405-408, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5424/sjar/2014122-5056>.

SANSINENEA, Estibaliz et al. An ultra-violet tolerant wild-type strain of melanin-producing *Bacillus thuringiensis*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 7, p. e20910, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5812/jjm.20910v2>.

SAMADA, Lukmanul Hakim; TAMBUNAN, Usman Sumo Friend. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **Online journal of biological sciences**, v. 20, n. 2, p. 66-76, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76>.

SÁNCHEZ-BAYO, Francisco; WYCKHUYS, Kris AG. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>.

SANCHIS, Vincent; BOURGUET, Denis. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 28, p. 11-20, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1051/agro:2007054>.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998>.

SCHULER, Tanja H. et al. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 168-175, 1998.

SHAO, Jiahui et al. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Microbial cell factories**, v. 14, p. 1-13, 2015. DOI 10.1186/s12934-015-0323-4.

SHELTON, Anthony Minot; ZHAO, J.-Z.; ROUSH, Richard Tyrone. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 845-881, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145309>.

SIAM, MA Habib et al. Sublethal effects of agricultural insecticides on honey bee behavior and colony sustainability: a review. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-10, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2025.2476230>.

SIMONATO, Juliana; GRIGOLLI, José Fernando Jurca; DE OLIVEIRA, Harley Nonato. Controle biológico de insetos-praga na soja. **Tecnologia e produção de soja 2013/2014, Controle biológico**, Embrapa. 2014.

SMITH, Dylan B. et al. Insecticide exposure during brood or early-adult development reduces brain growth and impairs adult learning in bumblebees. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1922, p. 20192442, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2442>.

SIREGAR, Elida Hafni; ATMOWIDI, Tri; KAHONO, Sih. Diversity and abundance of insect pollinators in different agricultural lands in Jambi, Sumatera. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 23, n. 1, p. 13-17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.11.002>.

STEFFAN-DEWENTER, Ingolf. Importance of habitat area and landscape context for species richness of bees and wasps in fragmented orchard meadows. *Conservation biology*, v. 17, n. 4, p. 1036-1044, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01575.x>.

STOFFEL, Janete; AREND, S. C. A produção orgânica como alternativa sustentável para a agricultura familiar. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Economia, Administração e Sociologia Rural**. v. 48, 2010.

SEIDE, Vanessa Eler et al. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1854-1860, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>.

SIMS, Steven R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CryIA (C)) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. 1995. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19961104080.

SIQUEIRA, Maria Augusta Lima. Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas. 54f (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Entomologia). Viçosa, MG: UFV), 2008.

STEINIGEWEG, Charlotte et al. Assessment of the impacts of microbial plant protection products containing *Bacillus thuringiensis* on the survival of adults and larvae of the honeybee

(*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 29773-29780, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12446-3>.

STEINIGEWEG, Charlotte et al. Impact of a microbial pest control product containing *Bacillus thuringiensis* on brood development and gut microbiota of *Apis mellifera* worker honey bees. **Microbial ecology**, v. 85, n. 4, p. 1300-1307, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02004-w>.

TAMEZ GUERRA, Patricia et al. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. **Ciencia UANL**, v. 4, n. 2, p. 143-152, 2001. Disponível em: <http://www.redalyc.org/pdf/402/40240205.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2025.

THAKORE, Yatin. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 194-208, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.194>.

THOMPSON, Helen M. Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. **Pest Management Science**, v. 66, n. 11, p. 1157-1162, 2010.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, Erubiel et al. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 1, p. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>.

TUDORAN, Amelia et al. A major forest insect pest, the pine weevil *Hylobius abietis*, is more susceptible to Diptera-than Coleoptera-targeted *Bacillus thuringiensis* strains. **Pest Management Science**, v. 77, n. 3, p. 1303-1315, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.6144>.

VALLET-GELY, Isabelle; LEMAITRE, Bruno; BOCCARD, Frédéric. Bacterial strategies to overcome insect defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 302-313, 2008.

VANBERGEN, Adam J. et al. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 11, n. 5, p. 251-259, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1890/120126>.

VANDENBERG, J. D.; STREETT, D. A.; HERBERT JR, E. W. Safety of Grasshopper Entomopoxviruses for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**, v. 83, n. 3, p. 784-787, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/83.3.784>.

VANENGELSDORP, Dennis et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.

VAN DER SLUIJS, Jeroen P. et al. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current opinion in environmental sustainability**, v. 5, n. 3-4, p. 293-305, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.05.007>.

VAN FRANKENHUYZEN, Kees. Specificity and cross-order activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. In: ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and Use in the Field of Biocontrol**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 127-172. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_10.

VAN LENTEREN, Joop C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, p. 39-59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

VASILIEV, Denis; GREENWOOD, Sarah. The role of climate change in pollinator decline across the Northern Hemisphere is underestimated. **Science of the Total Environment**, v. 775, p. 145788, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145788>.

VELTHUIS, B.-J.; VELTHUIS, H. H. W. Columbus surpassed: Biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 330-333, 1998. <https://doi.org/10.1007/s001140050509>.

VELTHUIS, H. W. Biologia das abelhas sociais sem ferrão. **São Paulo, EDUSP. 33p**, 1997.

VERMA, S. K. Studies on the control of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. in *Apis cerana* F. colonies with the biological insecticide, Dipel. 1995. DOI: cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19970200886.

VIANA, Blandina Felipe et al. How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services?. **Journal of Pollination Ecology**, v. 7, 2012. DOI: [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2012\)2](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2012)2).

VIANA-SILVA, Flávia et al. 1.12 Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 462, p. 56-61, 2018. DOI [10.5073/jka.2018.462.013](https://doi.org/10.5073/jka.2018.462.013).

WANG, Su-Yan et al. Biocontrol Ability of the *Bacillus amyloliquefaciens* Group, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*, for the Management of Fungal Postharvest Diseases: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 70, n. 22, p. 6591-6616, 2022. DOI: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c01745?ref=PDF>.

WARREN, GREGORY W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. **Advances in insect control: The role of transgenic plants**, p. 109-121, 1997.

WEAVER, Nevin. Physiology of caste determination. **Annual review of entomology**, v. 11, n. 1, p. 79-102, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.000455>.

WILKINSON, Mike J. Abandoning 'responsive'GM risk assessment. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 438-439, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.006>.

WILLIAMS, Ingrid H.; CHRISTIAN, D. G. Observations on *Phacelia tanacetifolia* Benth (Hydrophyllaceae) as a food plant for honey bees and bumble bees. **Journal of Apicultural Research**, 1991, 30.1: 3-12. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.1991.11101227>.

WILSON, Edward O. The insect societies. **Cambridge: Belknap Press**, 1971. 548 p. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19720503745>. Acesso em: 30 mar. 2025.

W. DICK, Christopher. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1483, p. 2391-2396, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1781>.

ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S. F. Capacidade termoreguladora em *Trigona spinipes* e em algumas outras espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Homenagem a Warwick Estevam Kerr**. Rio Claro, São Paulo, p. 301-309, 1972.