

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas
Apis mellifera

Raulene Rodrigues Lobo

Pelotas, 2019

Raulene Rodrigues Lobo

Os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas

Apis mellifera

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Gilberto D'Avila Vargas

Coorientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Antônio Russo Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Vilas Boas

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L799i Lobo, Raulene Rodrigues

Os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas *Apis mellifera* / Raulene Rodrigues Lobo; Gilberto D'Avila Vargas, Geferson Fischer, orientadores; Paulo Antônio Russo Almeida., Miguel José R. Vilas Boas, coorientadores. — Pelotas, 2019.

75 f.: il.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Apis mellifera*. 2. Suplementação artificial. 3. Abelhas. 4. Sanidade. I. Vargas, Gilberto D'Avila, orient. II. Fischer, Geferson, orient. III. Almeida., Paulo Antônio Russo, coorient. IV. Boas, Miguel José R. Vilas, coorient. V. Título.

CDD: 638.144

Raulene Rodrigues Lobo

Os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas
Apis mellifera

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/08/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Dr Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas (Orientador) (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (Brasil).

Prof. Dr Prof. Dr. Geferson Fischer
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas (Brasil).

Prof. Dr. Paulo António Russo Almeida.
Doutor em Ciência Animal pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Portugal).

Dr. Jerri Teixeira Zanuzo
Doutor em Ciências Agrônômicas pela Universidade INP-ENSA Toulouse (França).

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida e pelo privilégio de ter Maria Ivanete Lobo como mãe e Raul Rodrigues Lobo como pai (in memoriam), que nunca mediram esforços para que alcançasse o dia de hoje, são minha inspiração e os que sempre acreditaram em mim mesmo quando nem eu mesmo acreditei... Muito obrigada.

Aos meus irmãos Luciano Lobo e Zequistilene Lobo que sempre procuraram me incentivar, agradeço-lhes profundamente, por vocês e pelas suas próprias famílias constituídas e que me dão alegria.

Ao meu esposo Eustaquio Alves, obrigada por estar ao meu lado, por ser meu companheiro em todas as batalhas, e foram muitas! Obrigada.

Agradeço aos meus sogros Gilton Lourenço e Eulina Alves pelo apoio a nós dedicado para a finalização de mais uma etapa.

Agradeço a todos as demais pessoas que de alguma forma fizeram parte de minha trajetória que esteve e continua presente meu professor Paulo Russo que sempre será para mim uma pessoa especial. Ao professor Miguel Vilas Boas agradeço a total disposição sempre que por mim foi procurado.

Helena Ferreira faz parte dos que me constituíram e é a quem expresso um sentimento de família, hora irmã, mas hora também como mãe exigente. Agradeço-te Helena, assim como agradeço igualmente a Carla Tomás que juntas me foram muitas vezes tutoras.

A Senhora Idalina, agradeço a eficiência inquestionável, a seriedade e, portanto, o exemplo que me fez seguir.

Ao José Teixeira, obrigada pela disposição de sempre contribuir com meus trabalhos laboratoriais de forma basilar e fundamental. Aos professores João (Joãozinho) pelo carinho diário, à Professora Ângela agradeço pelos ensinamentos que, se não fosse por via de seus conhecimentos a mim postos à disposição, seria simplesmente pela sua presença de paz e conforto. À professora Tereza Rangel agradeço pelo carinho e atenção que bem sei, são para pouco, o que me faz sentir privilegiada.

Agradeço a professora Anabela Alves e a técnica Lígia Lourenço pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Em nome de Rosa, que me mostrou com simplicidade algumas coisas importantes sobre a vida, agradeço a equipe técnica de manutenção e limpeza que sempre estiveram comigo em meus turnos extras.

Aos amigos Ana Motta, Sara Laranjeira, Sara Reis, Bruno, Cristina, Margarida, José Alegre, Nuno Leitão, Enoque, Pedro, Diana, obrigado por fazerem parte da minha história dentro e fora da academia.

Ao amigo Noel Cardoso, que desde a minha chegada em Portugal me ajudou, sou muito grata pelos seus ensinamentos e raspanetes.

Agradeço à Ana Bela Ribeiro pela sua existência em Portugal, a qual garantiu nosso conforto e tranquilidade para seguir lutando. Muito obrigado.

Agradeço também, Tó Martins, que até onde pôde, soube me apoiar e contribuir para minha batalha.

Agradeço ao Coro Câmara da UTAD e o Coro do Corpo de Bombeiros Voluntários da Cruz Verde pelos momentos compartilhados.

Todos estes nomes, endereçados em Portugal, são aqueles que me fazem concluir sobre o melhor país que se pode viver além do meu pátria amada Brasil.

Na trajetória do Brasil muitos também foram muito e de longa data. Em Especial Terezinha Pascualoto e Jorge (in memoriam) obrigada eternamente...

Obrigado à Dona Márcia, Leca e Zeca, palavras apenas não descrevem minha gratidão.

Obrigada aos amigos Alice, Cristina, Cloé, Fernando, Paulo, por sempre estarem comigo quando precisei, na academia e além dela.

Aos professores Silvia e Marcelo do Labvir pelos ensinamentos e momentos de convívio.

Ao meu coorientador professor Geferson Fisher por me acompanhar também durante esta segunda etapa em minha carreira acadêmica, obrigada pelos ensinamentos e paciência.

Obrigado ao meu orientador Gilberto D' Avila Vargas que me abriu a porta principal para que eu hoje chegasse aqui. Se aqui cheguei, sei bem onde e com quem foi o início. Obrigado professor Gilberto! Obrigado a todos...

“Aprendi com as primaveras a deixar-me cortar e voltar sempre inteira”
Cecília Meireles

Resumo

LOBO, Raulene Rodrigues. **Os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas *Apis mellifera***. 2019. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A espécie de abelhas *Apis mellifera* é uma das principais espécies produtivas no meio apícola. Na busca por resultados satisfatórios, este setor tem encontrado algumas dificuldades, entre elas está a sanidade das colônias. Para alcançar melhores resultados na sanidade e, conseqüentemente, na produção apícola o manejo neste setor exige cuidados diversos por parte dos apicultores, entre eles está o cuidado com a nutrição das colônias que varia de acordo com as estações do ano. Conforme a carência de cada colônia há a necessidade de fornecimento de suplementação alimentar em períodos de escassez de alimento que neste caso conduz muitos apicultores a recorrer à suplementação artificial comercial. A suplementação artificial fornecida para as colônias é comumente composta por alimentos energéticos e proteicos e se mostra eficiente para, além das práticas apícolas comuns como suporte para criação de rainhas, combate à reprodução de varroa através do fortalecimento das colônias que também beneficia a microflora intestinal das abelhas além da possibilidade de promover a prevenção da nosema. entre outros fatores positivos relativos à sanidade apícola. Este trabalho pretende avaliar a eficiência de um modelo de gaiola modificado para manutenção de abelhas em condições laboratoriais como também avaliar os efeitos de 14 suplementos alimentares administrado as abelhas inoculadas com esporos de *Nosema ceranae* (4 dias de idade) avaliando as diferentes variáveis como a longevidade, contabilização de esporos, avaliação histopatológica e PCR. Nos resultados obtidos demonstraram diferenças na longevidade e em todos 31 suplementos inicialmente ocorreu uma elava taxa do número de esporos e conseqüente redução. Na avaliação histológica as amostras analisadas apresentaram alterações morfológicas e presença de esporos no interior e exterior das células do 34 epitélio ventricular. Nossos resultados demonstram a necessidade de ampliar estudos na área de suplementação como via de prevenção e tratamento para *Nosema ceranae*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; *Nosema ceranae*; esporos; histologia; suplementação

Abstract

LOBO, Raulene Rodrigues. The impacts of artificial supplementation on bee health *Apis mellifera* 2019. 78f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019

The bee species *Apis mellifera* is one of the main productive species in the apiculture environment. In the search for satisfactory results, this sector has found some difficulties, including the health of the colonies. In order to achieve better health results and, consequently, beekeeping production, management in this sector requires different care by beekeepers, including care with colony nutrition that varies according to the seasons of the year. Depending on the needs of each colony, there is a need to provide food supplementation in periods of food shortage, which in this case leads many beekeepers to resort to commercial artificial supplementation. Artificial supplementation provided to the colonies is commonly composed of energy and protein foods and is effective in addition to common apicultural practices such as support for rearing queens, combating varroa reproduction by strengthening the colonies which also benefits the intestinal microflora of the colonies. bees beyond the possibility of promoting the prevention of nosema. among other positive factors related to bee health. This work aims to evaluate the efficiency of a modified cage model for bee keeping under laboratory conditions as well as to evaluate the effects of 14 food supplements administered to bees inoculated with *Nosema ceranae* spores (4 days old) by evaluating the different variables such as longevity, spore counting, histopathological evaluation and PCR. The results showed differences in longevity and in all supplements initially there was a high rate of spore number and consequent reduction. In the histological evaluation the analyzed samples showed morphological alterations and presence of spores inside and outside the ventricular epithelium cells. Our results demonstrate the need to expand supplementation studies as a way of prevention and treatment for *Nosema ceranae*.

Keywords: *Apis mellifera*; *Nosema ceranae*; spores; histology; supplementation.

Lista de Figuras

Figura 1	Seleção de cria operculada no apiário.....	28
Figura 2	Núcleo.....	28
Figura 3a	Telas de proteção metálica.....	29
Figura 3b	Caxilho com a proteção metálica.....	29
Figura 4	Copo plástico de 300ml.....	29
Figura 5	Tira de cera laminada.....	30
Figura 6	Corte transversal.....	31
Figura 7	Palitos para fixação superior e inferior.....	31
Figura 8	Fixação da cera laminada.....	31
Figura 9a	Tampa.....	31
Figura 9b	Tampa com a abertura.....	31
Figura 10	Microtubo tipo <i>ependorf</i> (alimentador).....	32
Figura 11	Suplementos nos alimentadores.....	32
Figura 12	Gaiola para acondicionamento de abelhas, desenvolvida a partir de copo plástico com lâmina de cera alveolada e os alimentadores feitos de microtubos plásticos, tipo <i>ependorf</i>	33
Figura 13	Suporte para a pesagem.....	34
Figura 14	Suporte para acomodação dos alimentadores.....	34
Figura 15	Limpeza das gaiolas pelas obreiras.....	35
Figura 16	Cera alveolada –“puxada” pelas abelhas operária.....	35
Figura 17	Alimentador de mel operculado.....	36
Figura 1	Evolução da sobrevivência de abelhas infectadas com <i>N. ceranae</i>	59
Figura 2	Evolução dos números de esporos de <i>N. ceranae</i> inoculados <i>A. m. iberiensis</i>	59

Figura 3	Produto PCR mostrando a amplificação do macerado dos abdomens das abelhas. (Poço1: 100bp plus DNA Ladder (Bioron®) 2% TBE agarose gel (SeaKem® LE) de uso rotineiro.....	60
Figura 4	Controle negativo com epitélio ventricular íntegro corado com HE.....	60
Figura 5	Controle positivo Epitélio ventricular íntegro (EV)com presença de esporos de Nosema ceranae (EN)corados com Giemsa.....	61
Figura 6	Controle positivo corado com Grocott demonstrando o epitélio ventricular (EV) células e epitélio rompudas (CE) e presença de esporos de Nosema ceranae (EN).....	61

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média de dias correspondente à longevidade das abelhas obtidas para cada suplemento alimentar em estudo. Médias associadas a letras em comum não são significativamente diferentes para $P \leq 0.05$ no Teste de Tukey HSD.....	58
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

LabApis	Laboratório Apícola
Labvir	Laboratório de Virologia e Imunologia
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
UFPeL	Universidade Federal de Pelotas
<i>N. apis</i>	<i>Nosema apis</i>
<i>N. ceranae</i>	<i>Nosema ceranae</i>
<i>A. mellífera</i>	<i>Apis mellífera</i>
HE	Hematoxilina e eosina
DNA	Ácido desoxirribonucléic
PCR	Reação em Cadeia da Polimeras
ANOVA	Análise de Variância

Lista de Símbolos

P	p-value
\leq	Menor ou igual
®	Marca registrada
*	Asterisco
° C	Grau Celsius

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Referencia Nutricionais.....	17
2.1 Proteínas	17
2.2 Carboidratos.....	18
3 Referências Sanitárias.....	18
4 Revisão de Literatura.....	21
4.1 Nosema.....	21
5. Objetivos.....	23
5.1 Objetivo Geral.....	23
5.2 Objetivo específico.....	23
6 Artigos.....	25
6.1 Artigo 1.....	25
6.2 Artigo 2.....	40
7 Considerações Finais.....	62
8 Referências.....	64
9 Anexos.....	69

1 Introdução

No contexto geral de investigação sobre apicultura, avanços significativos ocorreram nas últimas décadas, porém, sabemos que muito ainda nos falta para darmos conta do entendimento que requer este seguimento específico do setor agropecuário, não só com referência direta aos produtos e benefícios que comumente as abelhas nos fornecem, mas também na maneira em que devemos lidar com elas de forma que possamos contribuir com a preservação e manutenção das diversas espécies existentes e que exploramos constantemente, entre elas a espécie *Apis mellifera*.

Tomando como pressuposto que o desenvolvimento do setor agropecuário, em diversas partes do globo, leva os fatores econômicos profundamente em consideração, é relevante salientar o aumento na produção apícola que entre 2013 e 2015 cresceu aproximadamente 10% em número de colmeias no contexto global (GPP, 2016), esta mesma fonte informa ainda que houve um aumento no número médio de colmeia por apicultor na ordem de 40%, o que sugere uma profissionalização da atividade.

Ao direcionar a devida atenção ao aspecto natural, sobretudo da atividade de polinização que desempenha esses insetos, além da produção de méis e outros produtos, é logicamente necessário conduzir estudos referentes a saúde das abelhas, de modo que o crescimento no setor não esteja desvinculado da preservação das espécies, em particular, àquelas espécies exploradas comercialmente pelo homem para assim evitar um desequilíbrio entre exploração e manutenção da população de abelhas existentes no planeta.

Neste sentido, os estudos desempenhados sobre estes insetos, importantes atores da manutenção da espécie humana, passa obrigatoriamente pelo campo da sanidade, onde se devem desenvolver estudos relevantes fundamentalmente para garantia da saúde desses insetos. É, portanto, o caso de conhecer as características históricas, biológicas, comportamentais e sanitárias que envolvem, particularmente, as abelhas da espécie *Apis mellifera* que neste caso, a partir basicamente da sua origem, Paulino (2008) *apud* Winston (1987) expõe a ideia de que ao longo da sua

evolução, esta espécie passou por modificações anatômicas e fisiológicas como forma de adaptação ao novo hábito alimentar.

Classificadas como insetos pertencentes à ordem dos himenópteros, as 2 abelhas são sociáveis e “formam comunidades com indivíduos que possuem tarefas específicas permitindo a sobrevivência da colônia” (FERNÁNDEZ, 2002).

Se sabe, ainda, que as abelhas necessitam de diferentes nutrientes em sua alimentação para suprir as suas carências nutricionais e que estes podem ser de origem natural ou artificial. Habitualmente, são fornecidos, por muitos apicultores, alguns alimentos artificiais como uma das formas de manutenção das colônias.

Para Kohsaka, et al., (2017), a alimentação artificial se mostra eficiente como suporte para criação de rainhas, combate à reprodução de varroa através do fortalecimento das colônias, benefícios para a microflora intestinal das abelhas, prevenção da nosema entre outros fatores positivos relativos à sanidade apícola.

Entre os nutrientes necessários para manutenção saudável de uma colônia estão as proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e sais minerais que são importantes para o desenvolvimento adequado da colônia como a reprodução e a longevidade da espécie (PAULINO, 2004).

Naturalmente, os alimentos básicos necessários para abelhas adultas são o néctar e o pólen, os quais, fornecem os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento de forma natural. No entanto, “a escassez destes nutrientes influencia na sobrevivência da colônia” (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

2 Referências Nutricionais

2.1 Proteínas

A fonte natural de proteína utilizada pelas abelhas é o pólen, mas este também fornece outros elementos como lipídios, vitaminas e sais minerais (HERBERT; SHIMANUKI, 1978). Conforme afirma Vásquez, Olofsson (2009) após a coleta do pólen as abelhas realizam a mistura de néctar regurgitado e algumas secreções. Conhecida como pão de abelha, esta mistura depositada nos favos contém alto teor de proteína, elemento fundamental para o desenvolvimento das abelhas. Um estudo apresentado por Lima (2013) *apud* Winston (2003) expõe que a necessidade de proteína está relacionada a idade das abelhas e que o consumo de pólen, principal provedor deste elemento, é relevante nos primeiros 5 a 10 dias de vida das abelhas operárias para que ocorra seu desenvolvimento adequado.

Entre os fatores que podem influenciar negativamente na sanidade das abelhas é possível salientar a ausência de proteína na colônia, onde as operárias adultas acabam realizando o canibalismo das larvas mais jovens para alimentar as mais velhas promovendo uma supressão da criação (SCHMICKL; CRAILSHEIM, 2001, 2002) tornando a colônia mais fraca e, certamente, mais vulnerável aos agentes patogênicos.

Quando o pólen se apresenta em níveis inferiores aos níveis adequados promove o atraso do desenvolvimento torácico (HAGEDORN; MOELLER, 1968), das glândulas hipofaríngeas (MAURIZIO, 1954; ALQARNI, 2006) e dos ovários (HOOVER *et al.*, 2006). É de salientar também que o desenvolvimento corporal está correlacionado com a ingestão de proteínas pelas abelhas (PERNAL; CURRIE, 2000).

Conforme descrito por Roulston *et al.*, (2000), as abelhas não sintetizam alguns dos aminoácidos e devem por isso obtê-los através da ingestão do pólen. Os aminoácidos essenciais que as abelhas necessitam em sua alimentação, de acordo com De Groot (1953), são: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano. Para o autor, os pólenes não são nutricionalmente iguais, de modo que as abelhas necessitam realizar a coleta de

diferentes pólenes presentes em seu entorno para suprir as suas necessidades de aminoácidos essenciais em sua dieta. Deste modo, é evidente a necessidade de uma suplementação balanceada e rica em proteínas.

2.2 Carboidratos

Os carboidratos também são componentes importantes na dieta das abelhas, pois contribuem significativamente para o desenvolvimento normal das adultas e das larvas, sua importância está relacionada à atividade muscular, manutenção da temperatura corporal e das funções vitais de alguns órgãos e glândulas (STANDIFER, *et al.*, 1977). Durante a fase de desenvolvimento das abelhas, a necessidade de carboidratos varia com a idade conforme assevera Barker; Lehner, (1974).

Hrassnigg; Crailsheim (2005) afirmam que a principal fonte de carboidratos na alimentação das abelhas é o néctar coletado pelas campeiras nos nectários florais e, posteriormente, são armazenados nos favos passando por processo físico e químico resultando em mel e que será utilizado como reserva de alimentos para consumo conforme a necessidade da colônia. Entre os carboidratos que podem ser utilizados pelas abelhas estão a glicose, frutose, maltose, sacarose, trealose e melitose, sendo que entre eles alguns como: xilose, galactose, lactose, melibiose, manose, rafinose e arabinose são tóxicos para as abelhas (BARKER; LEHNER, 1974; BARKER, 1977) e podem causar danos significativos para saúde desses insetos.

Em se tratando da sanidade das abelhas é de se considerar fundamental a preocupação em investimentos no conhecimento da necessidade nutricional desses insetos, visto que deste modo, elas são capazes de permanecerem fortes e saudáveis quando inseridas em ambientes propícios para seu desenvolvimento; a saber, ambientes capazes de lhes oferecerem, principalmente, uma diversidade de alimentos compostos por elementos básicos e necessários em suas dietas como é o caso das proteínas e carboidratos.

3 Referências Sanitárias

Obviamente, todas preocupações sanitárias devem ser estudadas para que se proporcione um avanço nas pesquisas sobre formas de proteção das colônias. Deste modo, investigar a microbiota das abelhas *A. mellifera* relacionada com a ingestão de suplementação artificial se mostra um estudo relevante para entender como esta prática pode influenciar no controle de doenças dessas abelhas no campo da prevenção.

Engel e Moran (2013) afirmam, “com base em descobertas até o momento, que as abelhas possuem uma microbiota estável e distinta, com conteúdo gênico...” e que, “...uma melhor compreensão do impacto da microbiota residente na saúde das 25 abelhas é ainda mais urgente”.

D’Alvise, *et al.*, (2017) concorda com “o fato de que a microbiota intestinal das abelhas melíferas contém tão poucas espécies, em comparação com outros animais, sugere um mecanismo eficiente que impeça a invasão por outras espécies bacterianas”. De modo geral, são diversas as doenças que acometem as *abelhas Apis mellifera*. Silva (2010) descreve dois grupos mais relevantes com referência às fases de cria e adultas, onde identifica para as crias a Podridão Americana, Podridão Europeia, Cria Ensacada e Cria Giz, e para as abelhas adultas o autor destaca doenças como Varroatose, Nosemose, Acariose, Mal de Outono e a Paralisia.

Como em outras partes do mundo (BOTÍAS *et al.*, 2009), em Portugal, bem como no Brasil, um exemplo de preocupação no meio apícola é a nosema a qual apresenta entre seus efeitos nocivos, descritos por Peldoza (2002), a perda de abelhas adultas entre finais de inverno e início de primaveras, diminuição da produção de mel, aumento do consumo de mel no inverno, além da parada na produção de geleia real comprometendo a produção de rainhas de qualidade e larvas saudáveis. Diante destes fatores, se pode evidenciar a nosema como uma importante doença

que coloca em risco colônias mal suplementadas durante períodos de escassez de alimento.

Um estudo realizado por Garrido *et al.*, (2007) demonstrou que a presença da *Nosema ceranae* presente nas localidades investigadas foi causa maior do desaparecimento de 2.915 colônias que totalizaram mais de 47% do total existente na região, onde se notou ainda a redução em mais de 42% na produção de mel por colmeia, mas o fator que mais nos chama a atenção em sua investigação é a associação direta da presença da nosema com a falta de capacitação no manejo e controle sanitário das colônias.

Garrido *et al.*, (2017) destaca também que recentemente tem surgido um enfoque distinto para o tratamento da nosema no campo das soluções a partir de substâncias de origens naturais provenientes de plantas ou óleos essenciais da flora nativa e que entre elas está o Nozevit®, Protofil®, Vitafeed Gold® e Api Herb®, porém, são produtos ainda muito caros devido a necessidade de importação, destaca o autor. este enfoque se confirma quando abordamos as orientações legais encontradas em manuais apícolas, tanto do Brasil como em Portugal, que orientam sobre o não uso de antibióticos na maioria dos casos em que as colônias são acometidas por patógenos (CAP, 2007; TEIXEIRA E MESSAGE, 2010).

Em muitos insetos, as comunidades bacterianas intestinais são altamente influenciadas pelo ambiente e pela dieta (Engel e Moran 2013) e por sua vez a saúde e resistência das abelhas melíferas são influenciadas pela sua microbiota intestinal onde sofre interferências pelas práticas apícolas (D'ALVISE *et al.*, 2017). Diante das afirmações desses autores, é relevante destacar que entre as práticas apícolas, a suplementação ocupa uma posição importante e fundamental na constituição da microbiota e, conseqüentemente, na saúde das abelhas.

4 Revisão da Literatura

4.1 Nosema

A Nosema é classificada como microsporídios denominados parasitas intracelulares obrigatórios (CORNMANN, *et al.*, 2009), e sua reprodução é através de esporos que os permitem resistirem as adversidades do ambiente (FRIES, 2010). Entretanto, até o momento, apenas três espécies de Nosema spp. apresentam a capacidade de infectar colônias de *A. Mellifera*, neste caso evidencia-se a *Nosema apis* (ZANDER, 1909), *Nosema ceranae* (FRIES *et al.*, 1996) e *Nosema neumannii* (CHEMURROT *et al.*, 2017). A primeira espécie de *N. apis* que acometeu abelhas *Apis mellifera* foi descrita por Zander (1909), posteriormente outra subespécie de Nosema foi descrita, sendo primeiramente encontrada em abelhas asiáticas denominadas *Apis.ceranae* em amostras investigadas pelo Instituto das Abelhas da Academia Chinesa de Ciências Agrárias de Beijin, China (FRIES *et al.*, 1996), esta subespécie de *Nosema*, denominada *N. Ceranae* foi relatada que havia migrado da Ásia para o oeste há algumas décadas e no momento apresenta-se como microsporídio predominante que infecta *A. mellifera* e encontra-se distribuída mundialmente (EMSEN, 2016; GISDER, 2017).

Recentemente foi descoberta por Chemurot *et al.*, (2017) uma nova subespécie, a *Nosema neumannii*, em Uganda nas zonas agro-ecológicas do leste e oeste das terras altas (AEZ) que também acomete as abelhas *A. mellifera*.

As abelhas se infetam através da ingestão dos esporos dos microsporídios presentes na água ou pólen (FRIES, 2010) outra forma que as operárias também podem se infectarem é através da atividade de limpeza da colônia entrando em contato com as fezes contaminadas com os esporos (HIGES *et al.*, 2010).

Na colônia os outros membros são infectados por *Nosema* através da "trophallaxis" (WEBSTER, 1993), "grooming" (WEBSTER, 1993; FRIES, 1988), mas nas atividades ao campo infectam com o material contaminado pelos esporos (COLOSS, 2009; FRIES, 2010).

No hospedeiro a infecção da *Nosema* é através de força física onde ocorre a penetração de um filamento polar na membrana da célula liberando o esporoplasma infeccioso no citoplasma e então é iniciada o processo de replicação e produção dos 34 esporos (LARSSON, 1986).

Após a infecção iniciada no hospedeiro, as consequências são distúrbios do trato digestivo, redução do ciclo de vida das abelhas, o desequilíbrio na colônia como também, redução da população e polinização (CARLETTO, *et al.*, 2013; FONTBONNE, *et al.*, 2013).

No diagnóstico laboratorial de *Nosema* várias metodologias podem ser empregadas, entre elas a microscopia óptica, microscopia eletrônica, métodos moleculares (PCR) e trabalhos como cultivo celular e confinamento em gaiolas para avaliar as diferentes variáveis existentes (FRIES *et al.*, 2013).

5 Objetivos

5.1 Objetivo Geral:

Embora diversos estudos tenham sido desenvolvidos ao longo da última década com o intuito de conhecer os impactos da *N. ceranae* em colônias de *A. mellifera* e a sua contribuição para a produtividade e conseqüentemente perda de colônias em todo o mundo, pouco se sabe sobre o impacto de suplementos alimentares na saúde das abelhas e como estes atuam no desenvolvimento da *N. ceranae* no trato intestinal. Assim, este estudo teve como principais objetivos estudar avaliar em ambiente controlado, os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas *A. mellifera*, inoculadas com esporos de *N. ceranae*.

5.2 Objetivos Específicos:

- Observar em ambiente controlado a reação abelhas inoculadas e os grupos controles frente aos suplementos administrados, nomeadamente, capacidade de resistência ao patógeno e longevidade da amostra;
- Testar o efeito dos referidos suplementos alimentares comerciais na longevidade e no grau de infestação em abelhas inoculadas com suspensão de esporos de *N. ceranae* e mantidas sob condições padronizadas;
- Descrição das alterações histológicas ao nível do tubo digestivo decorrentes da ação de *N. ceranae* em função do tempo pós inoculação e do suplemento fornecido;

- Em suma, procurar, através das metodologias aplicadas, comprovar ou refutar supostos benefícios que advém da sua ingestão no que diz respeito à saúde das abelhas

6 Artigos

6.1 Artigo

Construção de gaiola para abelhas *Apis mellifera iberiensis* em laboratório

Raulene Rodrigues Lobo; José Luis Fernandes Teixeira; Carla Alexandre Ferreira Coutinho Tomás; Miguel José Rodrigues Vilas Boas; Paulo António Russo Almeida; Geferson Fischer; Gilberto Davila Vargas

Publicado na revista Brazilian Journal of Development

Construção de gaiola para abelhas *Apis mellifera iberiensis* em laboratório **Construction of cage for *Apis mellifera iberiensis* bees in the laboratory**

Resumo. Diversos estudos têm sido desenvolvidos para obtenção de um ambiente laboratorial adequado, que permita a elaboração de experimentos *in vitro* com abelhas *Apis mellifera*, de forma a reproduzir o seu ambiente natural e avaliar diferentes variáveis que interferem no seu ciclo de vida. No entanto, desenvolver uma metodologia padronizada adequada ainda é um grande obstáculo a ser superado. Diversos materiais e métodos são utilizados para fins de pesquisa, mas ainda apresentam algumas limitações. Assim, este trabalho teve como principal objetivo propor uma metodologia de elaboração de gaiolas e alimentadores com material reciclável, possíveis de ser autoclavados a 130°C por 30 minutos sendo a pressão de acordo com o protocolo do laboratório) e reutilizados. O material utilizado para a confecção das gaiolas foi o copo plástico transparente de 300 ml, com perfurações nas laterais (12 furos) e na parte superior (4 furos) para permitir a ventilação dentro da estufa. Para a alimentação foi utilizado 14 suplementos foram distribuídas da seguinte forma 8 com suplementos energéticos e 4 com suplementos proteicos e um a gaiola com mel e outra somente com água potável. Como objetivo de simular o ambiente da colônia foi introduzida uma tira de cera laminada no centro da gaiola, para permitir a agregação das abelhas e acesso aos alimentadores. Para o manejo de retirada das abelhas mortas foi confeccionada uma abertura na tampa inferior da gaiola, com um dispositivo que permitiu a abertura e o fechamento do mesmo. Essas modificações auxiliam na condução de estudos *in vitro* de forma prática e segura para os operadores, sem causar fatores de estresse nas abelhas e reproduzir mais fielmente o ambiente natural das colônias. Este estudo utilizou 14 gaiolas com 50 abelhas que alcançaram 22 dias de longevidade com isso demonstrou otimizar os trabalhos realizados em laboratório, neste caso direcionado ao estudo das abelhas *Apis mellifera*, mas que poderá, em fases posteriores, ser devidamente adaptado a outros insetos sociais.

Palavras chave *Apis mellifera*, gaiolas, *in vitro*, manutenção.

Abstract. Several studies have been developed to obtain an adequate laboratory environment, which allows the development of *in vitro* experiments with *Apis mellifera* bees, in order to reproduce the natural environment and evaluate different variables that interfere in the life cycle. However, developing an adequate standardized methodology is still a major obstacle to be overcome. Several materials and methods are used for research purposes, but still have some limitations. Thus, this work had as main objective to develop and present a methodology for the elaboration of cages and feeders with recyclable material, which can be autoclaved and reused. The material used to make the cages was the transparent plastic container, with wholes on the sides and on the top to allow ventilation. To reproduce the environment of the colony, a strip of laminated wax was introduced in the center of the cage, to allow the aggregation of bees and to provide access to feeders. For the management of removal of dead bees, an opening was made in the bottom cover of the cage, with a device that allowed to open and close the cage. These modifications help to conduct *in vitro* studies in a practical and safe way for operators, without causing stress factors in bees and more faithfully reproducing the natural environment of the colonies. This study aimed to optimize the work carried out in the laboratory, in this case directed to the study of *Apis mellifera*, but which may, in later stages, be properly adapted to other social insects.

Keywords: *Apis mellifera*, cages, *in vitro*, maintenance

Introdução

Os estudos conduzidos em laboratório com abelhas *Apis mellifera* spp. ainda apresentam alguns obstáculos para os investigadores. A apicultura é uma atividade realizada há milhares de anos datada de aproximadamente 2.400 a.C. Os primeiros relatos desta atividade são atribuídos aos povos egípcios que utilizavam potes de barro para alojar as abelhas. Apesar dos egípcios serem considerados pioneiros na apicultura os gregos já usavam recipientes confeccionados com palha trançada em formato de colmo para colocar os enxames o que deu origem ao nome colmeia.

A *Apis mellifera* (abelha europeia) tem origem na Ásia e na Europa sendo as colônias formadas por diferentes castas a Rainha (responsável pela ovoposição), o zangão (função de fecundar a rainha) e as operárias que realizam diferentes tarefas (SENAR, 2010). A distribuição geográfica da *Apis Mellifera* é bem heterogênea desde de savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas tendo uma ampla diversidade de clima e vegetação proporcionou várias subespécies ou raças de abelhas capazes de adaptação em diferentes condições ambientais (Pereira, et al 2003).

As abelhas realizam uma atividade de grande relevância para a biodiversidade através da polinização. Além de sua importância no equilíbrio biológico elas despertam o interesse em outros setores importantes como é o caso do setor apícola, um fato que promove o estreitamento da sua relação com o homem por via da exploração econômica cujo desenvolvimento sendo constante.

As abelhas do gênero *Apis mellifera* surgiram a partir de um grupo de vespas que modificaram sua dieta alimentar, anteriormente baseada em insetos e ácaros para usarem como fonte de nutrientes em sua alimentação o néctar e o pólen que segundo Paulino (2008 apud WINSTON, 1987), ao longo da evolução da espécie passou por modificações anatômicas e fisiológicas como forma de adaptação ao novo hábito alimentar.

São necessárias condições laboratoriais e metodologias adequadas que permitam a manutenção das abelhas em ambiente confinado o mais próximo possível do natural. De acordo com Williams et al. (2013), a manutenção de abelhas adultas *in vitro* consiste em alojá-las em gaiolas que possibilitem as avaliações das abelhas em confinamento de forma individual ou em grupo, em ambiente controlado. Esta metodologia permite avaliar diferentes aspectos como administração de produtos parasitários Maistrello et al. (2008), toxicologia Johnson et al. (2009), interação parasita-hospedeiro Forsgren & Fries (2010) e fisiologia Alaux et al. (2010).

Além disso, a manutenção de abelhas *in vitro* permite a avaliação da sua longevidade Brighenti et al. (2008); Turcatto (2011) bem como a verificação de comportamento e resposta à estímulos mecânicos Carvalho et al.(2009).Com o mesmo objetivo vários pesquisadores utilizaram diferentes materiais para confecção das gaiolas como Turcatto (2011) que usou material plástico e microtubos adaptados para suplementação, já Brighenti et al. (2008) e Carvalho et al. (2009), usaram o PVC (Policloreto de vinilo) e ambos introduziram tecido de filó como vedação na parte superior e forneceram água destilada embebida em algodão. Pereira et al. (2007) e Kulencevic & Rothenbuhler (1972), optaram por madeira na confecção das gaiolas com laterais de vidro e piso telado e na suplementação líquida usaram orifícios na parte superior e a pastosa em tampas plásticas. Analisando os diferentes materiais e metodologias empregadas por pesquisadores na confecção de gaiolas, o nosso objetivo foi aprimorar as metodologias usadas, visando à manutenção de abelhas *Apis mellifera iberiensis* operárias recém-nascidas *in vitro*, utilizando materiais simples, como copo e microtubos de material plástico e estruturando de forma a garantir conforto para as abelhas e praticidades aos pesquisadores.

Metodologia

A primeira fase da pesquisa *in vitro* em laboratório utilizou abelhas *A. m. iberiensis* previamente selecionadas no campo de colônias saudáveis do apiário (41°N. e 7°W) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD/ Portugal). Após a seleção, os caixilhos de cria operculada (Figura1) foram retirados das colônias e transportados para o Laboratório Apícola (LabApis/UTAD), com posterior acondicionamento em um núcleo (Figura 2) a fim de aplicar maior cuidado possível para os opérculos entre o apiário e o laboratório.

Figura 1: Seleção de cria operculada no apiário.



Figura 2: Núcleo.

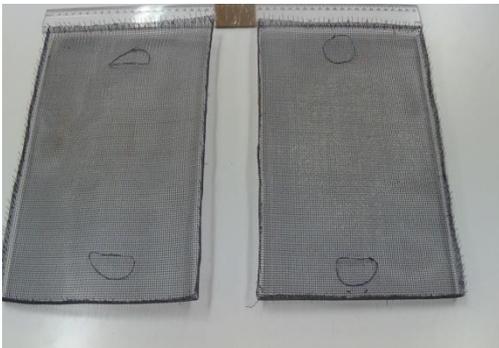


Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Após a chegada ao laboratório, foram instaladas telas metálicas nos caixilhos operculados, com dimensões de 29,3/29,5 cm (Figura 3), para proteção e contenção das abelhas em ambos os lados do quadro. com objetivo de evitar o seu acesso ao alimento, naturalmente presente no caixilho, após o nascimento. Posteriormente a realização deste processo, os caixilhos foram mantidos em estufa a 35°C e com 70% de umidade até as abelhas operárias emergirem.

Figura 3a: Telas de proteção metálica.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Figura 3b: Caixilho com a proteção metálica.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

As abelhas que emergiram dos caixilhos após 10 horas foram acondicionadas em gaiolas de copos plásticos. A estrutura da gaiola foi baseada em um modelo descrito por Willian et al. (2013), com algumas modificações. Foram utilizados copos plásticos transparentes de 300 ml (Figura 4), que permitiram o acondicionamento adequado para 50 abelhas. Nestas estruturas foram feitos orifícios laterais e superiores em série, para permitir a ventilação proveniente do interior da estufa em que as gaiolas foram acondicionadas durante a fase experimental. Ainda com a preocupação de reproduzir um ambiente semelhante ao da colônia, uma tira de cera laminada foi introduzida na gaiola originada a partir do corte dimensionado de uma lâmina de cera usada comumente nos apiários. Este corte deve possuir dimensões proporcionais às dimensões do copo utilizado, a saber, neste caso, comprimento de 3 cm de largura e 12 cm de comprimento (Figura 5).

Figura 4: Copo plástico de 300ml.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

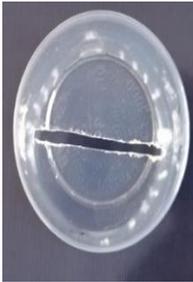
Figura 5: Tira de cera laminada.



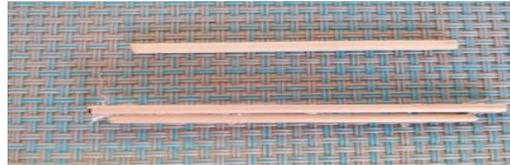
Fonte: Arquivo do autor, 2019.

A fixação da cera nas gaiolas, através da abertura transversal (Figura 6) na sua parte superior, foi feita com palitos de madeira (Figura 7) de comprimento equivalente ao diâmetro do copo utilizado (Figura 8). Estes palitos foram instalados de forma perpendicular à cera, na posição horizontal. Na parte inferior da gaiola a cera foi fixada com palito duplo, o que permitiu a retirada de abelhas mortas de dentro da gaiola. Para garantir a segurança contra eventuais fugas de abelhas e também para o auxílio do manuseio periódico, na parte inferior da gaiola foi colocada uma tampa com abertura de forma retangular (225 x 200 mm) sendo realizado um corte em apenas 3 lados do retângulo e uma linha pelo lado externo, favorecendo o manuseio e garantindo total fechamento após cada procedimento de retirada das abelhas mortas na gaiola (Figura 9a/9b).

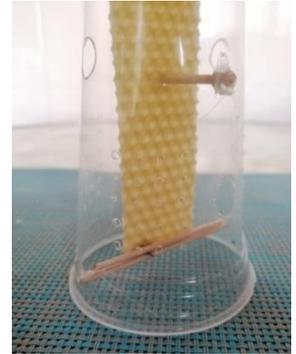
Figura 6: Corte transversal Figura 7: Palitos para fixação superior e inferior. Figura 8: Fixação da cera laminada



Fonte: Arquivo do autor, 2019.



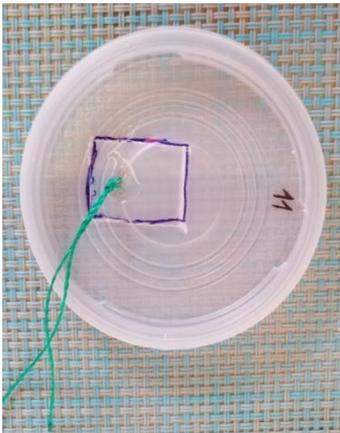
Fonte: Arquivo do autor, 2019.



Fonte: Arquivo do autor,

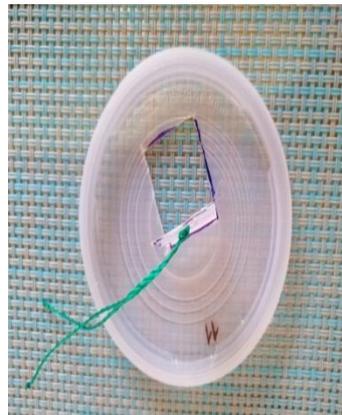
2019.

Figura 9a: tampa.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Figura 9b: Tampa com abertura.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

No fornecimento dos suplementos foram utilizados microtubos tipo *eppendorf* de 2ml que foram feitos 3 orifícios com diâmetro entre 3,8 e 4,0 mm (Figura 10) possibilitou uma distribuição e acesso das abelhas confinadas aos suplementos (Figura 11).

Figura 10: Microtubo tipo *ependorf* (alimentador).



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Figura 11: Suplementos nos alimentadores.

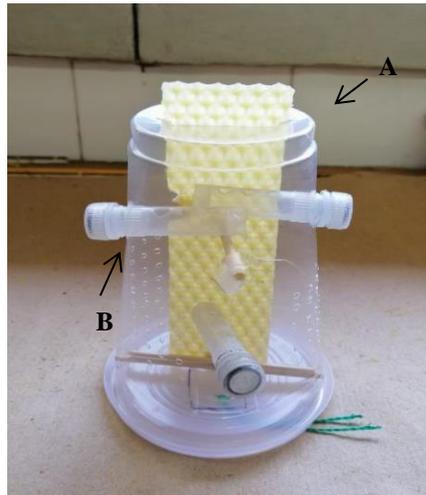


Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Foram fornecidas as abelhas operárias em cada gaiola (Figura 12) um suplemento diferente, em uma gaiola foi disponibilizado somente um alimentador com água e em outra uma gaiola com mel e nas outras gaiolas foram distribuídas da seguinte forma 8 com suplementos energéticos e 4 com suplementos proteicos. Os suplementos alimentares foram fornecidos às abelhas em alimentadores de pequeno volume para evitar que se deteriorem. Os alimentadores, que são introduzidos diariamente por substituição nas respectivas gaiolas, tal procedimento foi realizado diariamente e com horário definido, descreve-se da seguinte forma: na primeira fase é realizado o abastecimento dos alimentadores e são dispostos em suportes para este fim que posteriormente foram pesados para obtenção do peso inicial.

As gaiolas foram retiradas da estufa para substituição dos alimentadores e contabilização de abelhas mortas registro e armazenagem (-34°C). Os alimentadores que foram retirados e pesados para obtenção do peso final para avaliar posteriormente o consumo de cada suplemento fornecido.

Figura 12. A - Gaiola para acondicionamento de abelhas, desenvolvida a partir de copo plástico com lâmina de cera alveolada e **B** – os alimentadores feitos de microtubos plásticos, tipo *ependorf*.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

No alojamento das 14 gaiolas procurou reduzir a variância utilizando abelhas de origem na mesma colônia, caso contrário fez-se a homogeneização das abelhas recém-nascidas (no máximo com 10h de vida), antes de as distribuir e alojá-las em número de 50 abelhas por gaiola. As gaiolas foram mantidas durante toda a fase do experimento totalizando 22 dias de longevidade em completa escuridão, em estufa ventilada e climatizada a 30°C e 60 a 70% de humidade. No manuseio diário foi utilizado luz vermelha, invisível para as abelhas.

Resultados e discussão

Este estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia (gaiola) que simulasse, *in vitro* e reproduzisse de forma mais viável ao ambiente natural de abelhas *A. mellifera* dentro da colônia.

O primeiro fator considerado no desenvolvimento da gaiola para contenção de abelhas *A. mellifera* foi o material utilizado para sua confecção, de modo que fosse acessível economicamente e facilmente disponível no mercado. Além disso, elegeu-se como material o copo plástico que proporcionou uma higienização adequada e facilitada, bem como sua reutilização. Estes fatores divergem da gaiola desenvolvida por Pereira et al., (2007) que utilizaram madeira como matéria prima, que não é tão acessível, dificulta a confecção e manuseio, mas concorda com o descrito por Huang et al. (2014) que, ao testarem diferentes materiais para a construção de gaiolas e alimentadores, concluíram que o material plástico e o

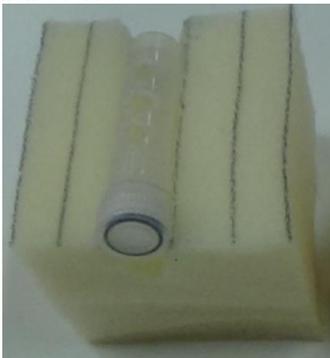
metálico com vidro, além de alimentador em forma de seringa, foi a combinação que proporcionou os melhores resultados no alojamento das abelhas.

Outro fator a ser considerado foi a utilização de alimentadores que permitissem administração dos suplementos das mais variadas formas seja líquida, pó ou pastosa podendo ser suplementos proteicos, energéticos ou vitaminas. O nosso estudo divergiu do descrito por Huang et al.(2014), que utilizaram diferentes modelos de caixas e alimentadores e concluíram que o uso da seringa foi a mais adequada para administração de suplementação líquida.

Os alimentadores adotados neste estudo permitiram o acesso eficaz das abelhas aos suplementos utilizados, proporcionando a introdução da proboscíde, impedindo que adentrassem no alimentador evitando assim o afogamento nos casos de administração dos suplementos líquidos ou a impregnação em seu corpo em suplementos pastosos e não conseguirem realizar uma higiene adequada, já que impediram que as abelhas adentrassem o alimentador. Esta metodologia é diferente daquela desenvolvida por Resende et al. (2019) que, para o fornecimento de água e suplementação líquida, usaram tampas plásticas com um chumaço de algodão em seu interior. Outra vantagem deste sistema de alimentação é a fácil higienização da lavagem e do autoclavamento, o que permite a sua esterilização e reutilização.

Para viabilização dos procedimentos de manuseio dos alimentos durante os experimentos, sugere-se a confecção de unidades extras de alimentadores, bem como de um suporte para pesagem dos suplementos (Figura 13) para sua acomodação durante o processo de abastecimento e pesagem, proporcionando facilidade e segurança contra possíveis acidentes que ocasionem perda de material. Este suporte pode ser confeccionado a partir de uma esponja com cava suficiente para abrigar a quantidade de alimentadores necessários para cada experimento (Figura 14).

Figura 13. Suporte para a pesagem. alimentadores.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Figura 14. Suporte para acomodação dos alimentadores.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

A colocação de uma pequena lâmina de cera alveolada na porção superior da gaiola, visando reproduzir os caixilhos na colônia, proporcionou às abelhas melhor acesso aos alimentadores, que foram colocados perpendicularmente através das laterais das gaiolas, e permitiu um ambiente próximo ao que ocorre dentro da colônia à campo, garantindo maior comodidade as abelhas e proporcionando sua agregação diferenciando dos outros trabalhos dos quais não havia a introdução de cera nas gaiolas Pereira et al. (2007); Brighenti et al. (2008); Carvalho et al. (2009);Turcatto (2011); Resende et al. (2019).

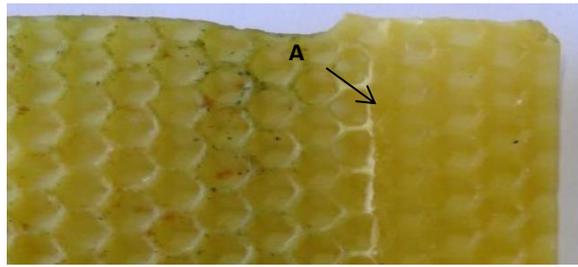
Este modelo de gaiola utilizado em nosso experimento também possibilitou observar a realização de algumas tarefas das abelhas operárias na colônia: as abelhas roeram a cera e retiraram-na para fora da gaiola através dos orifícios utilizados para ventilação, demonstrando bom comportamento higiênico (15). Além disso, “puxaram a cera” (deposição de cera produzidas pelas abelhas na cera laminada), comportamento que se observa nas colônias, principalmente quando são introduzidos quadros com cera laminada onde posteriormente serão depositados néctar e pólen, demonstrando comodidade as abelhas (Figura 16).

Figura.15 – Limpeza das gaiolas pelas obreiras.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

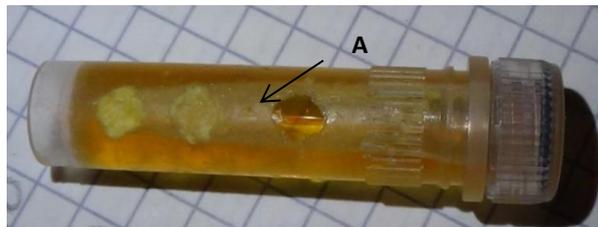
Figura 16. A - Cera alveolada –“puxada” pelas abelhas operária



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

Em alguns casos, também se observou a operculação (Figura 17) dos alimentadores quando houve administração de suplemento energético (mel). Esta tarefa normalmente é realizada, na colônia, nos favos onde as abelhas depositam néctar e pólen como forma de armazenamento do alimento, demonstrando que a gaiola propiciou um ambiente muito próximo daquele que ocorre à campo, uma vez que realizaram, *in vitro*, tarefas do cotidiano.

Figura 17. A - Alimentador de mel operculado.



Fonte: Arquivo do autor, 2019.

A confecção de uma tampa com corte realizado nos 3 lados do retângulo na parte inferior da gaiola com auxílio de uma linha fixada na parte externa demonstrou praticidade favorecendo o manuseio e garantindo total fechamento após cada procedimento de retirada das abelhas mortas, uma vez que não houve estresse nas abelhas operárias que permaneceram na gaiola. O ambiente controlado demonstrou ser livre de estresse, simulando o naturalmente vivido pelas abelhas à campo, é um requisito fundamental em pesquisas laboratoriais que necessitem de manipulação de abelhas *in vitro*.

Considerações finais

O desenvolvimento de uma gaiola para contenção de abelhas *A. mellifera*, bem como de um sistema de alimentadores a partir de materiais simples e baratos, como copo plástico e microtubos, demonstrou ser uma metodologia viável. Isso pôde ser comprovado pela prática

das abelhas, em ambiente controlado e sob condições adequadas de ventilação, temperatura e umidade, de diversas ações que realizam nas colônias a campo, como faxina (cera, linhas e partes de abelhas mortas) puxar a cera e operculação em um dos orifícios do alimentador com mel.

A abertura na tampa para retirada das abelhas mortas facilitou o manejo e evitou o estresse das abelhas que permaneceram vivas dentro da gaiola que permaneceram calmas realizando as atividades normais na gaiola. Isso comprova o potencial deste método para avaliações *in vitro* de abelhas *Apis mellifera* e cria a possibilidade de uso em meliponídeos e outros insetos sociáveis.

Este estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia (gaiola) que simulasse, *in vitro*, que reproduzisse de forma mais viável ao ambiente natural de abelhas *A. mellifera* dentro da colônia. Esta metodologia possibilitará estudos em laboratório, sob condições controladas, e de modo a eliminar fatores externos que possam interferir no tempo de vida útil de uma abelha.

Agradecimentos

A Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível pelo financiamento da bolsa de Doutorado fundamental para realização desse trabalho.

Agradeço a professora Anabela Alves e a técnica Lígia Lourenço pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho do laboratório de histologia e anatomia patológica- Universidade de Trás – os -Montes e Alto Douro/UTAD. A assistente técnica Idalina Mesquita Aboleleira, pela contribuição nesse trabalho no laboratório Apícola da Universidade de Trás – os -Montes e Alto Douro – LABAPIS- UTAD

Ao meu esposo Eustaquio Alves pela dedicação e compreensão na realização desse trabalho.

Ao meu grande amigo Danniell Rocha Bevilaqua pelo apoio e orientação na finalização deste trabalho.

Referências

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honey bee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562-565. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>.

- Brighenti, C. R. G., Cirillo, M. A. & Brighenti, D. M. (2008). Análise longitudinal na determinação do fotoperíodo adequado para criação de abelhas em laboratório. *Revista Brasileira de Biometria*, 26, (3), 111-124.
- Carvalho, S. M., Carvalho, G.A., Carvalho, C. F., Bueno Filho J. S. S. & Baptista, A. P. M. (2009). Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: apidae). *Arquivos Instituto Biológico*, 76(4), 597-606. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5972009>.
- Forsgren, E. & Fries, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170, (3-4), 212-217, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>
- Huang, K. S., Csaki T., Doublet, V., Dussaubat, C., Evans, J. D., Gajda A. M., Gregorc, A., Hamilton, M.C., Kamler, M., Lecocq, A., Muz, M. N., Neumann, P., Özkirim, A. S., Sohr, A. R., Tanner, G., Tozkar, C. Ö., Williams, G. R., Wu, L., Zheng, H. & Chen, Y. P. (2014) Evaluation of Cage Designs and Feeding Regimes for Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Laboratory Experiments. *Journal of Economic Entomology*, 107, 54-62. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13213>.
- Johnson, R. M., Pollock, H. S. & Berenbaum, M. R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 474-479. DOI: <https://doi.org/10.1603/029.102.0202>.
- Kulincevik, J.M. & Rothenbuhler, W.C. (1972). Laboratory and field measurements of hoarding behavior in the honey bee. *Journal of Apicultural Research*, 12(3), 179-182. DOI <https://doi.org/10.1080/00218839.1973.11099746>.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F. & Granato, A. (2008). Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honey bees. *Apidologie*, 39, 436-445. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2008022>.

PAULINO, F. D. G. Alimentação em *Apis Mellifera* L.: EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS E ALIMENTOS 2008. Palestra apresentada no 1. Simpósio de Nutrição e Alimentação Animal realizada na XIII. Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 2008.

Pereira, F.M., Freitas, B.M., Neto, J. M.V., Lopes, M. T. R., Barbosa, A.L., Camargo, R. C. R., Ribeiro, V. Q. & Rocha, R. S. (2007). Efeito Tóxico De Alimentos Alternativos Para Abelhas *Apis Mellifera*. *Ciência Rural*, 37(2), 533-538. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000200037>.

Pereira, F.M, Lopes, M.T.R, Camargo, R.C.R, Vilela, S.L.O. Sistemas de Produção: Produção de Mel. Embrapa Meio Norte. ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica Jul/2003. Acesso 07 do junho de 2022. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckg3d_hb02wx5eo0a2ndxyu6qshyx.html

Resende, L, F, S., Brighenti, C, R, G., Brighenti, D, M. & Carvalho, L.M. (2019). Modelos de sobrevivência para avaliação de intoxicação por repelentes a base de Neem em *Trigona spinipes*. *Ciência Agrícola*, 17(1), 37-48. DOI: <https://doi.org/10.28998/rca.v17i1.5183>

SENAR (2010). Abelhas *Apis mellifera*: instalação do apiário / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. 2. ed. Brasília

Turcatto, A.P. Desenvolvimento e análise do efeito de dietas protéicas como suplementação nutricional para abelhas *Apis mellifera*. 2011. 74f. . Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

Williams, G, R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Elisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Tomás & Murray., Myrsini & Natsopoulou., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, Stephen. F., Shutler, D., Tanner, G., Steen, J. J.M.V.D. & Brodschneider. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages

under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*; 1,1-36. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

6.2 Artigo 2

Os efeitos dos alimentos suplementares na saúde das abelhas: São os tratamentos eficazes contra *Nosema ceranae*?

The Effects of Supplemental Foods on Bee Health: Are Treatments Effective Against *Nosema Ceranae*?

Raulene Lobo, Helena Ferreira, Carla Tomás, José Teixeira, Anabela Alves, Lígia Lourenço, Miguel Vilas-Boas, Paulo Russo-Almeida, Geferson Fisher, Gilberto Vargas

Será submetido à revista Ciência Rural

RESUMO

Diversos estudos têm sido desenvolvidos ao longo da última década com o intuito de entender os impactos da *Nosema. ceranae* em colônias de *A. melliferas*, sua influência na produtividade e conseqüentemente a perda de colônias em todo o mundo. Pouco se sabe sobre o impacto de suplementos alimentares na saúde das abelhas e como estes alimentos atuam no desenvolvimento da *N. ceranae* no trato intestinal das abelhas *A. melliferas*. Assim, este trabalho tem como principal objetivo apresentar um estudo avaliativo em ambiente controlado com o intuito de ressaltar os impactos da suplementação artificial na sanidade das abelhas *Apis mellifera*, inoculadas com esporos de *Nosema ceranae*.

Palavras chaves: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*., Suplementação artificial, saúde.

I Universidade Federal de Pelotas (UFPeL)- Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

II Instituto Politécnico de Bragança, (IPB) Bragança, Portugal.

III. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro,. (UTAD), Vila Real, Portugal, 5000-801 Vila Real prussoalmeida@gmail.com . *Autor para correspondência

ABSTRACT

Although several studies have been developed over the last decade in order to understand the impacts of *N. ceranae* on *A. mellifera* colonies and their contribution to productivity and consequently loss of colonies worldwide, little is known about the impact of food supplements on bee health and how they act on the development of *N. ceranae* in the intestinal tract. The objective of this study was to evaluate the impact of artificial supplementation on the health of *Apis mellifera* bees inoculated with spores of *Nosema ceranae*.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, artificial supplementation, health.

INTRODUÇÃO

Mesmo diante de vários estudos desenvolvidos ao longo da última década com o intuito de conhecer os impactos da *N. ceranae* nas colônias e sua interferência para a produtividade e em última análise, perdas de colônias. Pouco se sabe sobre como os suplementos alimentares podem impactar a saúde das abelhas e, conseqüentemente, o desenvolvimento de *N. ceranae* no intestino médio.

Conforme FRIES (2010), as abelhas se infectam através da ingestão dos esporos dos microsporídios presentes na água ou pólen. Outra forma que as operárias também podem se infectar é através da atividade de limpeza da colônia, entrando, em contato com as fezes contaminadas com os esporos (HIGES et al., 2010).

No interior da colônia os outros membros são infectados por *Nosema* spp. através da “trophallaxis” (WEBSTER, 1993) “grooming” (WEBSTER, 1993; FRIES, 1988), mas nas atividades ao campo se infectam com o material contaminado pelos esporos (COLOSS, 2009; FRIES, 2010).

Já nos hospedeiros a infecção da *Nosema* é através de força física onde ocorre a penetração de um filamento polar na membrana da célula liberando o esporoplasma infeccioso no citoplasma e então é iniciada o processo de replicação e produção dos esporos (LARSSON, 1986). Após a infecção iniciada no hospedeiro, as conseqüências são apresentadas como distúrbios do trato digestivo, redução do ciclo de vida das abelhas, o desequilíbrio na colônia como também, redução da população e polinização (CARLETTO, et al., 2013; FONTBONNE, et al., 2013).

No diagnóstico laboratorial de *Nosema* várias metodologias podem ser empregadas, entre elas a microscopia óptica, microscopia eletrônica, métodos moleculares (PCR) e trabalhos como cultivo celular e confinamento em gaiolas para avaliar as diferentes variáveis existentes (FRIES et al, 2013).

Então, com base numa justificativa teórica como expressa acima, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a eficácia de um total de 14 suplementos alimentares disponível no mercado e acessível aos apicultores, que pretende melhorar o sistema imunológico das abelhas e consequentemente reduzir o impacto de *N. ceranae* e, além disso, também pretendemos compartilhar o entendimento sobre como esses suplementos alimentares mudam a dinâmica da estrutura do intestino médio. Para, a partir daí saber como se pode promover resistência contra estes parasitas através de estudos com análises histológicas das abelhas infectadas com suspensões de *N. ceranae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este foram utilizadas abelhas operárias da subespécie *Apis mellifera iberiensis* obtidas em maio de 2019, a partir de quadros com criação operculada de colônias saudáveis do apiário experimental do laboratório apícola – LabApis da Universidade de Trás-os-Montes e Auto Douro- UTAD.

Os quadros com criação operculada foram direcionadas ao LabApis e mantidas no laboratório em estufa a 35°C e humidade controlada até que as abelhas emergissem. Após um período de 10 horas as abelhas emergidas foram homogeneizadas e acondicionadas em gaiolas onde foram utilizados 14 suplementos diferentes, disponíveis no mercado apícola destinadas a suplementação como meio de prevenção e/ou tratamento da nosemose.

Foram realizadas 4 repetições para cada suplemento com controle para cada uma das repetições, contendo em cada gaiola com 50 abelhas, tendo dois controles um positivo (inoculado com Nosema) e o negativo (sem inoculação). As gaiolas foram mantidas em completa escuridão, em estufa ventilada e climatizada a 30°C e 60 a 70% de humidade.

(WILLIAM et al, 2013)

Na obtenção dos esporos de *Nosema* spp. Foram coletadas abelhas *Apis iberiensis* no apiário de investigação do LabApis. No laboratório as abelhas foram eutanasiadas utilizando CO₂. Posteriormente realizou a contagem das abelhas. Após a contagem foram realizadas a técnica de dissecação das abelhas de acordo com o descrito por D'Alvise et al., (2017), que consiste na retirada do trato gastrointestinal das abelhas utilizando uma pinça tracionando-o a partir do segmento terminal.

O trato gastrointestinal das abelhas dessecadas foi colocado em um tubo falcon com esferas metálicas para maceração da amostra. Para avaliação da presença dos esporos na amostra foi adicionado 20µl na Câmara de Neubauer para visualização e contagem dos esporos em microscópio óptico.

Após a maceração foi realizada a purificação da amostra (suspensão de esporos) para remover presença de resíduos teciduais. Nesta fase é feito a filtração a vacum (filtro P2), (PRATES DUMAS France/ 90mm) e gaze com objetivo de remover a presença de resíduos maiores.

Neste procedimento além da remoção dos resíduos maiores ainda proporciona uma amostra com melhor visualização para contagem dos esporos de *Nosema* spp. na Câmara de Neubauer utilizando o microscópio óptico.

Na técnica de centrifugação o tubo falcon contendo as amostras são colocados na centrífuga, 5.000g por cinco minutos, para obtenção do pellet de esporos. Após a centrifugação descarta-se o sobrenadante que contém os resíduos dos tecidos que são mais leves que os esporos presentes na amostra.

O pellet é resuspendido em água destilada e colocado no Vortex (Zx³ R5) por cinco segundos. Sugere-se repetir o processo para obtenção de uma suspensão de esporos de *Nosema* com mais de 85% de nível de pureza (FRIES et al., 2013).

A realização das reações de PCR foram feitas em um termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller). A técnica de PCR foi realizada de acordo com o descrito por Hamiduzzaman et al, (2010). Em cada reação 15µL continha 1,5 µL Tampão de PCR (New England BioLabs, Pickering, Ontário), 0,5 µL DNTPs 10 mM (Bio Basic Inc., Markham, Ontário), 1µL 10µM para cada primer (Laboratório de Serviços da Universidade de Guelph), 0,2 µL 5 U / µL Taq polimerase (New England BioLabs, Pickering, Ontario), 2 µL de amostra de DNA (10 ng em 2 µL) e 8,8 µL d H₂O.

O termociclador foi programado com a 94 °C por 2,5 min, seguido por 10 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 61,8 °C e 45 s a 72 °C e 20 ciclos de 15 s a 94 C, 30 s a 61,8 C e 50 s a 72 °C, e uma etapa final de extensão a 72 ° C por 7 min, contendo reações a 4 ° C o resto do tempo (modificado de MARTIN-HERNÁNDEZ et al., 2007). DNA obtido a partir do recém-surgido mel *Nosema*-negativo abelhas foram utilizadas como controle negativo nos experimentos.

Os Primers utilizados para o gene *Nosema* 16S rRNA foram MITOC-F (5' CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA) e MITOC-R (5'CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG) para produzir um produto de PCR de 218 pb específico para *N. ceranae* e APIS-F (5'GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA) e APISR (5'GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG) para produzir um produto de PCR de 321 pb específico para *N. apis* (MARTIN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

As abelhas utilizadas foram separadas em 04 lotes para respectivas repetições e mantidas em estufa sendo suplementadas como o mesmo suplemento (solução de sacarose 50%, albumina e água) até o momento da inoculação dos esporos de *Nosema*. Antecedendo o momento da inoculação a recomendação é que seja feita a interrupção do fornecimento dos suplementos por 02 a 04 horas para garantir que abelhas fiquem com fome suficiente para que o inócuo seja ingerido rapidamente (FRIES *et al.*, 1992; MALONE; STEFANOVIC, 1999;

HIGES *et al.*, 2007; MAISTRELLO *et al.*, 2008). Neste trabalho utilizamos, em todas as repetições, 3 horas de retirada dos suplementos afim de se obter o mesmo objetivo.

A inoculação dos esporos de *Nosema* foi realizada de acordo com o descrito por FRIES *et al.*, (2013), administrando os esporos em solução de sacarose em alimentadores *ad libitum* permitindo uma inoculação rápida podendo ser realizada entre 2 e 5 dias de idade. Neste trabalho, mantivemos uma padronização da inoculação ao 4º dia idade. Após a administração do inócuo, as abelhas permaneceram na estufa em plena escuridão por um período de 24 horas onde foram adicionados uma solução de sacarose 50% para manter as abelhas saciadas evitando que ocorresse morte por falta de suplementação. Em seguida do período pós inoculação foram inseridos os suplementos a serem testados.

Diariamente foi realizado o manejo das abelhas sendo suplementadas com a troca dos suplementos periodicamente contando ainda, em seu monitoramento, com a retirada das abelhas mortas.

A fundamentação teórica para este experimento partiu de HIGES *et al.*, (2007); MARTIN-HERNANDEZ *et al.*, (2011); FORSGREN; FRIES, (2010) onde observaram que após 10 dias de inoculação os esporos encontram-se desenvolvidos e as abelhas puderam ser submetidas aos exames necessários, neste caso, análise microscópica, PCR e histopatológicos.

Diariamente as abelhas mortas de cada suplemento utilizado eram retiradas das gaiolas, contabilizadas, identificadas e armazenadas em freezer -38°C. Posteriormente as abelhas mortas foram selecionadas a partir de 17 e 21 dias pós a inoculação sendo o intervalo pré-estabelecido de 4 dias para cada amostra analisada. A quantidade de abelhas utilizada foi variável devido que nem todos os 14 suplementos utilizados tiveram a mesma mortalidade (mortas/dia) nos intervalos anteriormente pré-estabelecidos.

Para verificação do aumento ou redução dos esporos da *N. ceranae* das abelhas que

foram previamente inoculadas ao 4º dia de vida e posteriormente suplementadas foi utilizado a Câmara de Neubauer. A primeira fase consistiu em contagem das abelhas em uma placa de petri e posteriormente a retirada individual do abdômen das abelhas que foram colocadas em um tubo falcon com esferas metálicas, adicionando 100µl de água destilada/abelha para realizar a maceração com agitação mecânica.

Após a maceração o material foi coado para a retirada das impurezas (resíduos teciduais) presentes da amostra, que foram armazenadas -38°C até o momento de utilização. Anteriormente a realização da contagem dos esporos as amostras foram descongeladas e homogeneizadas no vortex (Zx³-R5) para a realização da diluição 10X (20µl da amostra e 180µl de água destilada).

Na avaliação dos esporos nas amostras foi usado a Câmara de Neubauer com uma lamínula no campo de contagem onde foi adicionado 20µl de cada amostra para o preenchimento da Câmara de Neubauer para realização da contagem.

A contagem é realizada em um microscópio óptico (Olympicus®), no aumento de 40x. São contabilizados 5 quadrantes (4 laterais/1 em cada ponta) e 1 ao centro) das duas câmaras (superior e inferior).

Para obter o valor da contagem total do Câmara de Neubauer é realizado o cálculo contabilizando o total dos quadrantes, com fator de diluição da amostra e quantidade de abelhas utilizadas.

Na análise histopatológica as amostras das abelhas mortas foram imediatamente fixadas em formalina neutra a 10%. Para as análises, um corte longitudinal foi feito em cada abelha. Os tecidos foram processados em um processador automático de tecidos (Shandon - Hipercenter XP®), com programa automático para alteração da concentração de xilol e álcoois, e embebidos em cera de parafina (Histoplast - Shandon®), com ponto de fusão entre 56°C e 57°

C. Cortes micrométricos de parafina foram cortados em micrótomo Leica Jung Biocut 2035® e rotineiramente corados com hematoxilina e eosina (HE), Giemsa, PAS Mc Manus e Grocott para exame histológico. As amostras foram então desidratadas utilizando uma concentração aumentada de álcoois e montadas com Entellen® (ref). As lâminas foram avaliadas em um microscópio Nikon Eclipse E600 e digitalizados usando o software de imagem de vídeo (ACT1 para a câmera digital Nikon DXM1200) (Laboratório de Histologia e Anatomia patológica da UTAD).

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente recorrendo a software JMP®, plataforma na qual se encontram implementados vários testes estatísticos. As diferenças entre os diferentes suplementos relativamente e a sua relação com a longevidade e quantidade de esporos foram efetuadas usando análises de variância (ANOVA). Quando as diferenças obtidas foram significativas para $p \leq 0.05$ realizou-se o teste de Tukey para determinar quais suplementos alimentares a que estavam associadas essas diferenças.

RESULTADOS

Neste estudo utilizamos 14 suplementos diferentes como objetivo de avaliar os efeitos sobre as abelhas *Apis m. iberiensis* inoculadas com o microsporídio *N. ceranae* mantidas em gaiolas em ambiente controlado. Na avaliação correspondente à média da longevidade das abelhas os resultados encontram-se expostos na tabela I. Os resultados obtidos através do teste ANOVA para a longevidade média das abelhas revelam diferenças significativas entre os suplementos alimentares administrados. Através do teste de Tukey verificou-se que a média de longevidade das abelhas que estavam a ser providenciadas com Apifonda foi significativamente maior (21,4^a) do que Apimida (13,1^c) controle positivo (14,3^{bc}).

Também o suplemento Hibee mostrou uma média superior (19,6^{ab}) e estatisticamente significativa quando comparada com o suplemento Apimida (13,1^c). Como seria esperado as

abelhas pertencentes ao controle negativo (20,3^a) apresentam uma média de longevidade significativamente superior ao do controle positivo (14,3^{bc})

Os suplementos quando avaliados em relação aos que obtiveram maior sobrevivência salientamos o Apifonda® (21 dias) e Hibe Real® (19 dias), além da diferença de sobrevivência cabe salientar que possuem composição diferentes classificados respectivamente como energético e proteico. Os demais suplementos administrados que são denominados suplementos alimentares

Relativamente a eficiência dos referidos suplementos alimentares comerciais no grau de infestação das abelhas inoculadas com suspensão de esporos de *N. ceranae* e mantidas sob condições padronizadas, foram avaliadas em microscópio óptico (Olympicus®) através da contabilização em do número de esporos em Câmara de Neubauer (Super Rior®).

Os resultados da evolução dos esporos relativamente ao tempo de coleta das amostras o suplemento que apresentou uma maior concentração de esporos na primeira coleta foi o suplemento Hibe que posteriormente ocorreu um decréscimo nas coletas seguintes. Outro fator a ser considerado que independente do suplemento administrado todos inicialmente tiveram uma elevada número de esporos na primeira coleta, mas nas coletas seguintes tiveram um declínio na contagem dos esporos. O controle negativo manteve-se igual como esperado devido a não inoculação dos esporos.

Na análise da técnica PCR foram avaliadas 37 amostras do macerado de abdomens das abelhas inoculadas com *Nosema spp.*, e submetidas ao tratamento com suplementos alimentares com o objetivo da identificação do microsporídeo. Foram realizadas 2/3 coletas das amostras diferenciando somente ao intervalo entre (4 dias).

As amostras A3, D9, A4, D10 são referentes a primeira coleta, mas apesar de na contagem dos esporos em Câmara de Neubauer apresentarem esporos os mesmos não

amplificaram uma das razões seria a degradação do DNA, o mesmo ocorreu na amostra B3 da segunda coleta, sendo somente amplificada na terceira coleta.

Na avaliação microscópica dos cortes histológicos foram utilizadas quatro colorações diferentes (Hematoxilina-Eosina/HE, Giemsa, PSA, Grocott) como objetivo de avaliar as alterações promovidas pelo microsporídio. Nos resultados obtidos a morfologia das células epiteliais da amostra (controle negativo) não apresentou alterações, mas nas demais amostras avaliadas houve lesões produzidas pela *N. ceranae*.

As lesões encontradas foram degeneração e necrose das células epiteliais, ruptura das membranas celulares com presença abundante de esporos em seu interior e no lúmen, epitélio ventricular necrosado, tubos de malpighi dilatados e infecção micótica secundária. Nos resultados obtidos amostra corresponde ao controle negativo (Figura4) apresenta parede do intestino e células epiteliais íntegras sem a presença de esporos, mas no controle positivo (inoculado *N. Ceranae*) verificamos ruptura células epiteliais (Figura 5) e presença de esporos no interior e exterior. Dentre as colorações utilizadas verificamos que Grocott (Figura 6) apresentou melhor visualização dos esporos presentes como as alterações na estrutura das células epiteliais.

DISCUSSÃO

Neste estudo com abelhas confinadas em gaiolas e mantidas sob controle de temperatura e umidade sendo suplementadas com Nozevit® e solução de sacarose a 50% apresentaram na primeira coleta com 17 dias pós infecção um aumento na contabilização dos esporos e posterior declínio na segunda e terceira coleta corroborando com o estudo realizado a campo com GAJGER *et al.* (2009) onde avaliaram duas formas de administração do Nozevit® para o tratamento da *N. ceranae*, um elaborado com solução preparada com Nozevit® e solução sacarose e outra com Dadant "Brood Builder" adicionado Nozevit® tendo como

controles pasta de pólen e solução de sacarose. As colônias foram avaliadas (12, 28, 40 e 60) dias pós-tratamento resultando, após a contabilização dos esporos, na redução significativa dos esporos nas colônias tratadas com diferentes formas de administração do Nozevit®.

No estudo realizado por HIGES *et al.* (2014) também obtiveram resultados em relação a redução dos esporos em colônias infectadas naturalmente, porém utilizaram dosagens diferentes das realizadas por outros pesquisadores diferenciando em resultados inferiores quando comparados com tratamento com fumegalina encontrados por Botías *et al.*, (2013). Os resultados no estudo realizado por Higes *et al.* (2014), na ausência de outros tratamentos, demonstram que o Nozevit® poderá ser utilizado, mas de forma integrada com o objetivo de controlar a evolução da *N. ceranae*.

Os resultados apresentados por MICHALCZYK *et al.* (2016) corroboram com os encontrados nos tratamentos utilizando Nozevit® e Apiherb® diferenciando somente em um suplemento alimentar que não utilizamos neste estudo, o Apix®.

Nos resultados encontrados em nosso estudo após a inoculação e tratamento realizados também obtivemos resultados como MICHALCZYK *et al.* (2016) que apresentaram redução dos esporos, mas não se apresentou totalmente eficaz pois mesmo depois do tratamento se mostraram presente, porém, em menor quantidade. MICHALCZYK *et al.* (2016) concluíram que os tratamentos com Nozevit®, Api Herb® e ApiX foram mais eficazes para *N. apis* em comparação com *N. ceranae*.

A metodologia empregada na técnica de PCR permite utilização de múltiplos primers que permitem amplificar de forma simultânea as regiões específicas do DNA da amostra analisada, é considerada teste de eleição na identificação simultânea *N. apis* e *N. ceranae* (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

De acordo com Botías *et al.* (2012) existem algumas variáveis em relação as amostras,

tais como o tamanho da amostra e época de coleta, que podem influenciar no diagnóstico, sendo assim recomendado a obtenção de um maior número de amostras e mais frequentemente para determinar a infecção de *Nosema* spp nas colônias. Tendo essa variável observada a campo e transpondo aos nossos resultados, alguns poderão não ter amplificado pelo fato da amostra ser pequena ou mesmo o DNA poderá ter se degradado devido a amostra obtida para realizar o PCR ser de abelhas mortas que foram recolhidas diariamente após a contabilização e posteriormente armazenadas a (-38°C).

DUSSAUBAT et al (2013) na avaliação das alterações histológicas utilizou o mesmo intervalo para obtenção das amostras (4 dias) com 12 e 16 dias pós infecção enquanto neste estudo utilizamos 2/3 coletas consoantes com as amostras das abelhas mortas, na primeira coleta 14/17 dias pós infecção.

De acordo com e seguido DUSSAUBAT *et al.* (2013) e observou evolução na quantidade de esporos entre os intervalos observados como também a presença de *N. ceranae* em diferentes estágios sendo que as células parasitadas se apresentavam degeneradas e a membrana peritrófica apresentou quebrada e fragmentada. Já os nossos resultados possuem algumas semelhanças, mas outras alterações também foram observadas como a degeneração e necrose das células epiteliais, ruptura das membranas celulares com presença abundante de esporos em seu interior e no lúmen, intestino necrosado, tubos de malpighi dilatados e infecção micótica secundária.

Neste estudo utilizamos abelhas recém nascidas acondicionadas em gaiolas com temperatura e umidade controlada, diferente do experimento realizado por MAIOLINO *et al.* (2014) que utilizaram abelhas adultas recolhidas de colônias, mas em suas avaliações foram condizentes com este estudo no caso em que as abelhas não apresentam diarreia ou qualquer alteração anatômica.

Entre as alterações observadas encontramos as mesmas alterações descritas por MAIOLINO *et al.* (2014) várias fases de desenvolvimento dos esporos que apresentaram corados de forma heterogênea sendo os maduros de forma basólica e os imaturos de forma a esvaziar. Em alguns dos suplementos que testamos também verificamos diferentes estágios dos esporos na mesma célula e também encontramos as formas dos esporos maduros e não maduros presentes no lúmen do intestino

De acordo com MAIOLINO *et al.* (2014) a técnica de histopatologia apresenta como uma metodologia sensível e específica na detecção de *nosemoses* nas colônias possuindo ainda como vantagem de fornecer o diagnóstico em colônias que não apresentam estar infectadas.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a técnica laboratorial Idalina pela ajuda na condução experimental e aos professores do LabApis/ UTAD (laboratório Apícola da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) pelo apoio prestado na condução experimental a campo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Pelo financiamento da bolsa de doutorado.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não temos conflito de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram de igual forma para elaboração deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

BOTÍAS, et al., The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. **Research in Veterinary Science**, v.93 n,1, p. 150-155, 2012.

BOTÍAS, C; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; BARRIOS, L; MEANA, A; HIGES, M *Nosema* spp. infection and its negative effects on honeybees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. **Veterinary Research**, v.44, p. 25, 2013

CARLETTO, J.; et al. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.113, p. 52-55, 2013.

CORNMAN, R.S.; et al. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. **PLoS Pathogens**, v5, p.6, 2009.

CHEMUROT, M., et al.. *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda **European Journal of Protistology** v.61,p. 13–19, 2017.

EMSEN B, et al.: Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. **Parasitology Research**, v.115,p.175-181. 2016

FONTBONNE, R.; GARNERY, L.; VIDAU, C.; AUFAUVRE, J.; TEXIER, C.;

TCHAMITCHIAN, S.; et al. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.17, p.188-194, 2013.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, p.S73-S79, 2010.

FRIES, I; et al. Standard methods for *Nosema* research, **Journal of Apicultural Research**, v.52:1, p. 1-28, 2013.

FRIES, I; GRANADOS, R. R; MORSE, R.A (1992) Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. **Apidologie**, v.23(1), p. 61-71,1992.

FRIES, I., et al. *Nosema ceranae* n.Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**. V.32, p.356–365, 1996.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in Europe honey bees (*Apis mellifera*) **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, p.573-579, 2010.

FRIES, I. Contribution to the study of *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Rapport 166, Sveriges Landbruks universitet, Institutionen för husdjurens utfodring och värd, Uppsala, Sweden, 1988. Material está descrito no link:

<<http://agris.fao.org/agrissearch/search.dorecordIDUS2004684>>..

FORSGREN, E; FRIES, I (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. **Veterinary Parasitology**, v. 170(3-4), p. 212-217, 2010.

GARCÍA-PALENCIA, et al. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*), **Journal of Apicultural Research**, v. 49:3, p. 278-283, 2010. .

GISDER S, et al. Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis*. *Front Cell Infect Microbiol*,v. 7, p.301,2017.

HIGES, M.,et al. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 211–217, 2007.

HUMAN, H; BRODSCHNEIDER, R; DIETEMANN, V; DIVELY, G; ELLIS,J;FORSGREN,

- E; FRIES, I; HATJINA, F; HU, F-L; JAFFÉ, R; KÖHLER,A; PIRK, C W W; ROSE, R; STRAUSS, U; TANNER, G; VAN DERSTEEN, J J M; VEJSNÆS, F; WILLIAMS, G R; ZHENG, H-Q. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V **Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK**, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, v,52(4), 2013.
- HIGES M, MARTIN-HERNANDES R, MEANA A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.92,p. 93-95, 2006;
- HIGES M, et al. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia) **Journal of Invertebrate Pathology**_; v.94, p.211-7, 2007
- HIGES, M; et al., The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. **Environmental and Microbiology Reports** v.2, n.6 p. 745-748, 2010.
- GAJGER I. T. et al. Nozevit patties” Treatment of Honey Bees (*Apis mellifera*) for the Control of *Nosema ceranae* Disease **American Bee Journal** v.149(11), p.1053-1056, 2009
- LARSSON, R., 1986. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Program.Protistol*, v. 1, p.325–390,1986.
- Maiolino P, et al. Histopathological findings of the midgut in European honey bee(*Apis Mellifera* L.) naturally infected by *Nosemaspp*. **Veterinary Medicine and Animal Sciences**, v.2, p.1-3, 2014;
- Higes, M, et al Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosemaceranae* control, *Journal of Apicultural Research*, 53:4, 472-474, 2014
- MAISTRELLO, L; et al. A Screening of natural compounds for the control of *nosema* disease in honey bees. **Apidologie**, v. 39(4), p.436-445,2008.

MALONE, L A; STEVANOVIC, D (1999) Comparison of the responses of two races of honey bees to infection with *Nosema apis* Zander. **Apidologie**, v. 30(5), p. 375-382,1999.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R et al. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honey bees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, v. 109(3), p.605-612, 2011.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., et al., Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Environmental Microbiol.** V73, n.20, p. 6331-6338, 2007.

MICHALCZYK Maria*, SOKÓŁ Rajmund, KOZIATEK Sylwia. EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF SELECTED TREATMENTS OF NOSEMA SPP. INFECTION BY THE HEMOCYTOMETRIC METHOD AND DUPLEX PCR. **Acta Veterinaria-Beograd** , v.66 (1),p.115-124,2016

WEBSTER T.C. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. **American Bee Journal**, v.133, p.869–870, 1993.

ZANDER, E (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* v.31,p,196–204.

Suplementos Alimentares	Média	Desvio Padrão
ContrPosit	14,3 ^{bc}	1,2
Apifonda®	21,4 ^a	1,2
Hibee Real ®	19,6 ^{ab}	1,2
HiveAlive ®	15,7 ^{abc}	1,2
Nozevit®	17,4 ^{abc}	1,2
Neonasopiol®	17,2 ^{abc}	1,2
VitafeedGold®	17,0 ^{abc}	1,2
Apiherb®	17,0 ^{abc}	1,2
Antivarnosem®	16,0 ^{abc}	1,2
Biogen®	17,2 ^{abc}	1,2
NutribeePropolis®	16,1 ^{abc}	1,2
Apimida ®	13,1 ^c	1,2
PromotorL 47 ®	17,2 ^{abc}	1,2
Startovit ®	16,4 ^{abc}	1,2
ControlNeg	20,3 ^a	1,2

Tabela 1.- Média de dias correspondente à longevidade das abelhas obtidas para cada suplemento alimentar em estudo. Médias associadas a letras em comum não são significativamente diferentes para $P \leq 0.05$ no Teste de Tukey HSD.

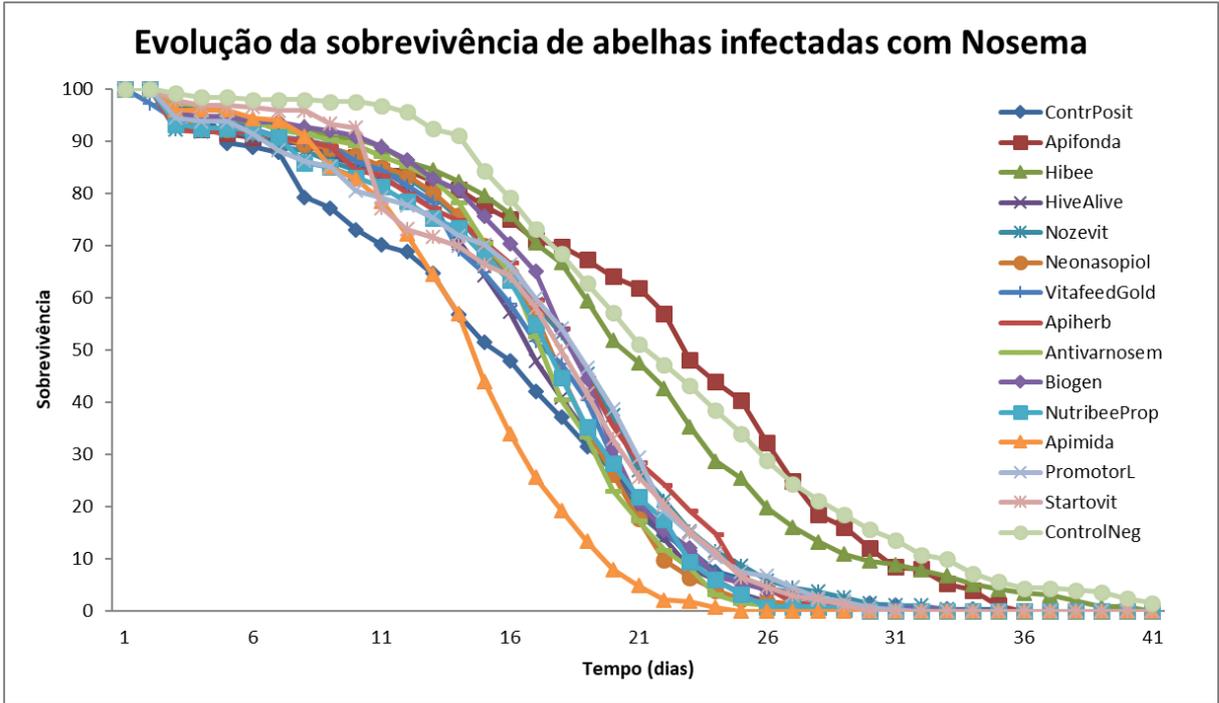


Figura 1 Evolução da sobrevivência de abelhas infectadas com *N.ceranae*

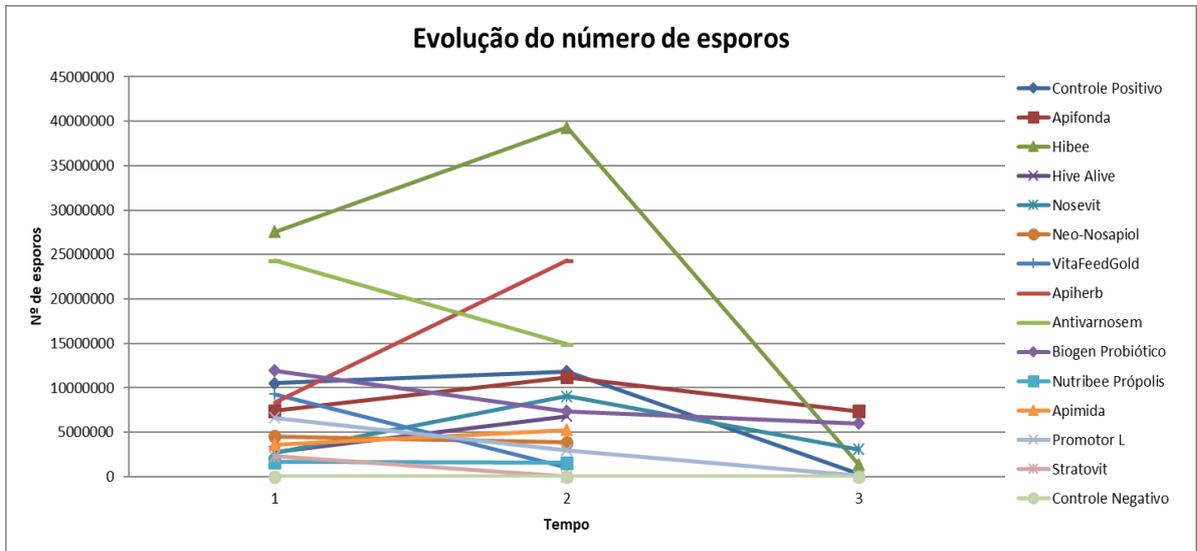


Figura 2- Evolução dos números de esporos de *N.ceranae* inoculados *A.m. iberiensis*

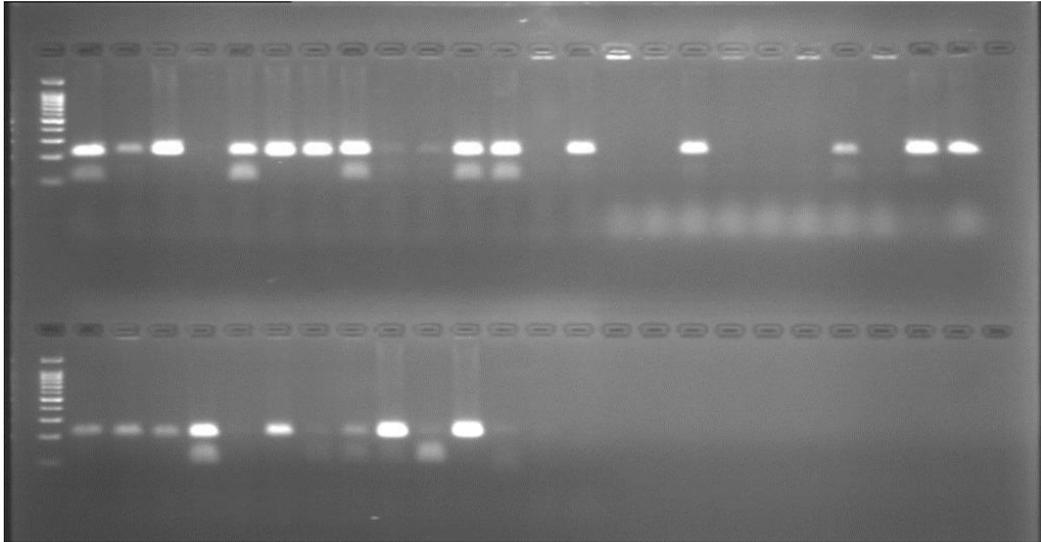


Figura 3- Produto PCR mostrando a amplificação do macerado dos abdomens das abelhas. (Poço1: 4 100bp plus DNA Ladder (Bioron®) 2% TBE agarose gel (SeaKem® LE) de uso rotineiro.

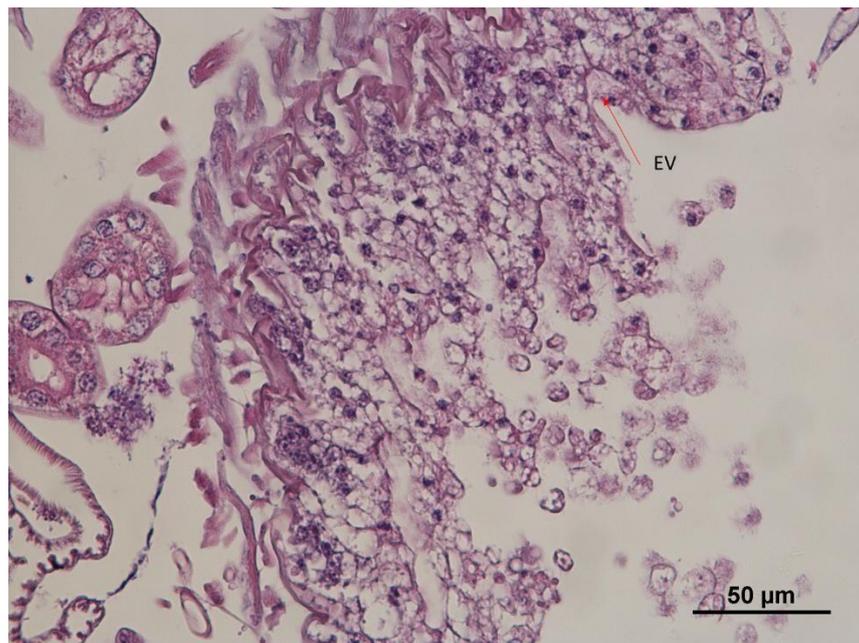


Figura 4 - Controle negativo com epitélio ventricular íntegro corado com HE

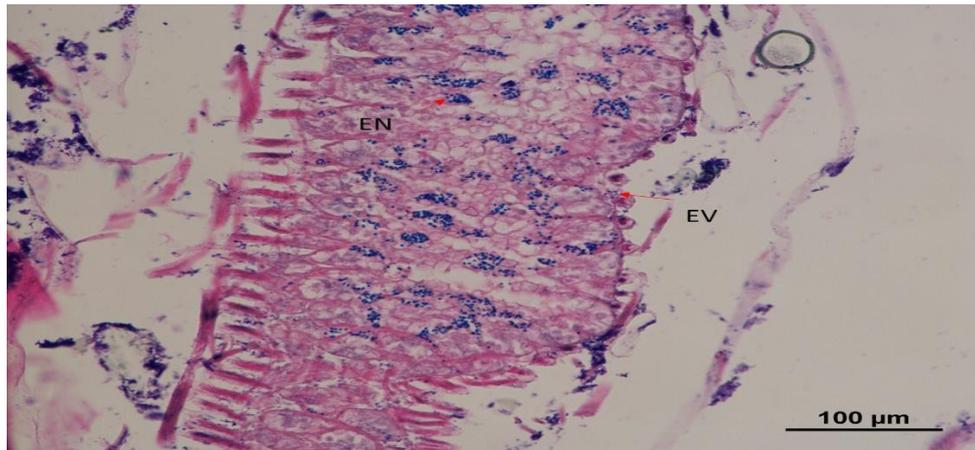


Figura 5- Controle positivo Epitélio ventricular integro (EV) com presença de esporos de *Nosema ceranae* (EN) corados com Giemsa:

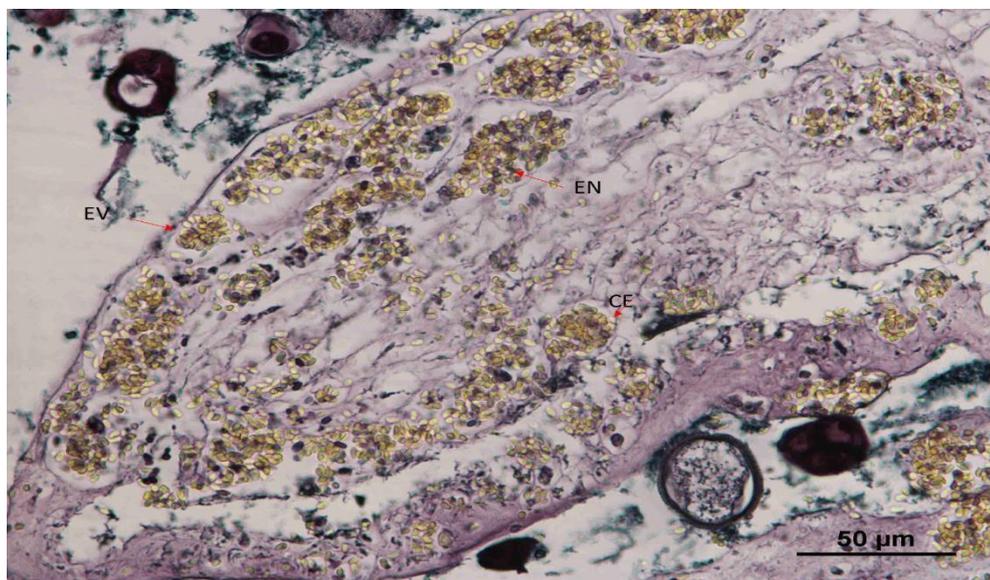


Figura 6 - controle positivo corado com Grocott demonstrando o epitélio ventricular (EV) células e epitélio rompudas (CE) e presença de esporos de *Nosema ceranae* (EN)

6 Considerações Finais

No presente trabalho em primeira fase verificou-se a eficácia da metodologia empregada na utilização de matéria prima acessíveis e de fácil aquisição afim de promover uma adequada manutenção de abelhas em laboratório podendo ser explorado para diversas variáveis tendo em conta neste método verificou-se uma adaptação das abelhas em ambiente controlado onde desenvolveram funções que são somente observadas a campo nas colônias como operculação do alimentador, limpeza com retirada da cera para fora das gaiolas e o fato de puxarem a cera laminada. Estes fatos reforçam que podem ser observados diferentes variáveis em ambiente controlado utilizando a metodologia desenvolvida e empregada neste estudo.

Na segunda fase foram avaliados a eficácia de 14 suplementos alimentares disponíveis no mercado apícola que possuem como objetivo o de melhorar o sistema imunológico das abelhas e conseqüentemente reduzir o impacto *Nosema spp.* Nos avaliamos em ambiente controlado as abelhas recém nascidas mantidas em gaiolas, que após ao 4º dia de idade foram inoculadas com suspensão de esporos em solução de sacarose a 50%. Após 24 horas da inoculação as abelhas foram suplementadas com os respectivos suplementos alimentares que foram substituídos a cada 24 horas e feita a contabilização das abelhas mortas.

As abelhas mortas foram identificadas e armazenadas em formol 10% para avaliação histologia armazenadas a -38°C para posterior contabilização dos esporos.

Os resultados demonstraram diferenças em relação à média de vida das abelhas, mas em relação a contabilização dos esporos nos 3 períodos analisados houve um aumento inicial e posterior declínio na 2ª e 3ª o mesmo ocorreu na avaliação histológica onde foi possível ver as alterações no epitélio ventricular e a presença de esporos nas 3 fases analisadas.

Este estudo demonstrou a importância da avaliação dos suplementos que podem ser utilizados para o tratamento de *Nosema spp.*, sendo necessários estudos futuros

a fim de avaliar quais elementos são capazes de promover um tratamento eficaz para o tratamento das colônias afim de evitar resíduos dos produtos da colônia.

Referências

- ALQARNI, A. S. Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers, **Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 734-737, 2006.
- BARKER, R. J. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. In: **Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1859-1862, 1977.
- BARKER, R. J.; LEHNER Y. - Acceptance and sustentative values of honey, the sugars of honey, and sucrose fed to cages of honey bee workers. In: **American Bee Journal**, v. 113, p. 370-3711, 1974 a.
- BOTÍAS, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., GARRIDO-BAILÓN, E. et al., *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species. In: Proc. 41st Congress Apimondia 15–20 September 2009 Montpellier (France). Ed. **Apimondia, Montpellier**, 2009.
- BRODSCHNEIDER R., CRAILSHEIM K. Nutrition and health in honey bees. In: **Apidologie**, v.41, p. 278–294, 2010.
- CAP – Departamento Técnico. **Manual de Sanidade Apícola**, 2007
- CARLETTO, J.; BLANCHARD, P.; GAUTHIER, A.; SCHURR, F.; CHAUZAT, M-P.; RIBIÈRE, M. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.113, p. 52-55, 2013.
- DUSSAUBAT, C, SAGASTUME, S, GOMEZ- MORACHO T, BOTIAS, C. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.670–678,2013
- CORNMAN, R.S.; CHEN, Y.P.; SCHATZ, M.C.; STREET, C.; ZHAO, Y.; DESANY, B.; EGHOLM, M.; HUTCHINSON, S.; PETTIS, J.S.; LIPKIN, W.I.; EVANS, J.D. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. **PLoS Pathogens**, v.5, p. 6, 2009.
- CHEMUROTA, M, SMT, LINA, BRUNAINA M, RYCKE, R. DE GRAAFA D.C. *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a newmicrosporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. **European Journal of Protistology**, v 61, p. 13– 19, 2017.

- D'ALVISE, P; BÖHME, F; CODREA, C, M; SEITZ, A; NAHNSEN, S; BINZER, M; ROSENKRANZ, P; HASSELMANN, M. The impact of winter feed type on intestinal microbiota and parasites in honey bees. **Apidologie**, p.1-13, 2017.
- DE GROOT, A. P. Protein and amino acid requirements of the honeybees (*Apis mellifera* L.). In: **Physiologia Comparata et. Oecologia**, v. 3, p. 197-285, 1953.
- EMSEN B, GUZMAN-NOVOA E, HAMIDUZZAMAN MM, ECCLES L, LACEY B, RUIZPE´REZ RA, NASR M: HIGHER. Prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. **Parasitology Research**, v.115, p.175-181. 2016
- ENGEL, P., MORAN, N.A. THE GUT MICROBIOTA OF INSETS – DIVERSITY IN STRUCTURE AND FUNCYION.FEMS **Microbiology**, v.37(5), p.699-735, 2013.
- EVANS, J. D; LOPEZ, D.L. Bacterial probiotics induce na immune reponse in the honey bee (*Hymenoptera: Apidae*). **Journal of Economic Entomology**, 740, vol.97 (3), p. 752-756, 2004.
- FERNÁNDEZ, A. **Manual Apícola para Pequeños Productores**. Promer, p. 51, 2002. FONTBONNE, R.; GARNERY, L.; VIDAU, C.; AUFAUVRE, J.; TEXIER, C.; TCHAMITCHIAN, S.; ALAOUI, H.E.; BRUNET, J-L.; DELBAC, F.; BIRRON, D.G. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. **Infection, Genetics and Evolution**, 17, 188-194, 2013.
- FORSGREN, E; OLOFOFSSON, T.C; VASQUEZ, A; FRIS, I. Novel lact acid bacteria innhibiting *Paenibacillus larvae*. **Apidologie**, v.41(1), p.99-108, 2010.
- FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, 103, S73-S79, 2010.
- FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S.B., PIENIAZEK, N.J., *Nosema ceranae* n.Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v.32, p.356–365,1996.
- GARRIDO, B et al., 2017. Composicion, metodo y uso para el control de la infeccion fungal del hongo de *Nosema ceranae* em colonias de abejas *Apis mellifera* (PA-CD14) de uma cantidade eficaz de um aceite esencial (CD14) obtenido desde las hojas de *Cryptocaria alba*, (N.V. PNEUMO).
- GISDER S, SCHU“LER V, HORCHLER LL, GROTH D, GENERSCH E: Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis*. **Front Cell Infection Microbiology**, v.7, p.301, 2017

- GPP – Gabinete de Planeamento Políticas e Administração Geral, 2016. Disponível em <http://www.gpp.pt/index.php/noticias/agricultura-silvicultura-e-pescaindicadores-2016> . Acesso em 25 de julho de 2018.
- HAGEDORN, H. H.; MOELLER, F. E. Effect of the age of pollen used in pollen supplements on their nutritive value for the honey bee. Effect of thoracic weight, development of hypopharyngeal glands, and brood rearing. In: **Journal of Apicultural Research**, v. 7, p. 89-95, 1968.
- HAMIDUZZAMAN, M. M., E. GUZMAN-NOVOA and P. H. GOODWIN. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.105, p. 151-155, 2010.
- HERBERT, E. W.; SHIMANUKI, H. Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. In: **Journal of Apicultural Research**, v. 17, p. 118-122, 1978.
- HOOVER, S. E.; HIGO H. A.; WINSTON, M. L. Worker honey bee ovary development :seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition, **Journal Comparative Physiology**, v. 176, p. 55-63, 2006.
- HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Differences in drone and worker physiology in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v.36, p. 255-277, 2005.
- INGEMAR FRIES, MARIE-PIERRE CHAUZAT, YAN-PING CHEN, VINCENT DOUBLET, ELKE GENERSCH, SEBASTIAN GISDER, MARIANO HIGES, DINO P MCMAHON, RAQUEL MARTÍN-HERNÁNDEZ, MYRSINI NATSOPOULOU, ROBERT J PAXTON, GINA TANNER, THOMAS C WEBSTER & GEOFFREY R WILLIAMS (2013) Standard methods for *Nosema* research, **Journal of Apicultural Research**, 52:1, 1-28, DOI: [10.3896/IBRA.1.52.1.1](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.1)
- KOHSAKA, R.; PARK, M. S.; UCHIYAMA, Y. Beekeeping and honey production in Japan and South Korea: past and present. **Journal of Ethnic Foods**, v. 4, n. 2, p.7279, 2017.
- LARSSON, R., 1986. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. **Program.Protistol**, v. 1, p.325–390, 1986.
- LIMA, E. G. **Características reprodutivas de rainhas africanizadas (*Apis mellifera*) silvestres no litoral de Alagoas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.
- MATILA, H.R et al. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. **Plos one**, v. 7(3), p. 329-262, 2012.
- MAURIZIO, A. Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.), **Landwirtsch. Jahrb. Schweiz**, v. 62, p. 115-182, 1954.

- PAULINO, F. D. G. **Alimentação em Apis Mellifera L.: EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS E ALIMENTOS** 2008. Palestra apresentada no 1. Simpósio de Nutrição e Alimentação Animal realizada na XIII. Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 2008.
- PAULINO, F. D. G. Apicultura – **Manual do Agente de Desenvolvimento Rural**. Brasília-DF: SEBRAE, 2004. cap. 13, p. 107-114: Alimentação Artificial.
- PELDOZA J. **Sanidad Apícola Nosemosis**. Curso de producción apícola. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 2002.
- PERNAL, S. F.; CURRIE, R. W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 31, p. 387-409, 2000.
- ROULSTON, T. H.; CANE J. H. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 187-209, 2000.
- SILVA, Felipe Silveira. **Revisão das doenças que podem acometer *Apis mellifera***. Dissertação (Graduação em MEDICINA VETERINÁRIA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- STANDIFER, L. N.; MOELLER, F. E.; KAUFFELD, N. M.; HERBERT, Jr., E. W.; SHIMANUKI, H. Supplemental feeding of honey bee colonies. United States Department of Agriculture. In: **Agriculture Information Bulletin**, n. 413, p.1-8, 1977.
- TEIXEIRA, E, W; MESSAGE, D. Abelhas *Apis mellifera* in: **Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras**, p.175-217, 2010.
- TEIXEIRA, José Luís Fernandes. **Efeito da suplementação alimentar na criação e performance de abelhas rainhas *Apis Mellifera***. 2017. 79f. Dissertação (Mestrado em ENGENHARIA AGRONÓMICA) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2017.
- WILLIAMS, R G et al. Standart methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. **Jornal of apicultural research**, v.52 (1), p.1-36, 2013.
- ZANDER, E (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31: 196–204.

Anexos

Protocolos de coloração da técnica histopatológica

Soluções coloração histológicas

Solução

- Hematoxilina -Eosina (H-E)/ Hematoxilina de Gill:

Aplicações:

- Método utilizado para visualizar estruturas tecidulares

- 15 A agitação e as pesagens devem ser cuidadosas. Juntar os reagentes pela ordem indicada, com cuidado, agitando sempre.
- | | |
|---------------------|-------|
| Água destilada..... | 710ml |
| Etileoglicol..... | 250ml |
| Hematoxilina..... | 4g |
- Agitar até que todos os reagentes se dissolvam por completo e acrescentar
- | | |
|----------------------------|-------|
| Iodato de sódio..... | 0,4g |
| Sulfato de alumínio..... | 32,5g |
| Ácido acético glacial..... | 40ml |
- Agitar aproximadamente 2h

Eosina Alcoólica:

Solução Stock:

- | | |
|---------------------|-------|
| Eosina Y..... | 10g |
| Água destilada..... | 200ml |
| Álcool a 95%..... | 800ml |
- Dissolver a eosina na água destilada e depois adicionar o álcool

Solução de trabalho:

- | | |
|------------|------|
| Eosina | |
| Stock..... | 10ml |
| Álcool a | |

80%.....70ml
Ácido acético (para cada 100ml de corante).....0,5ml

Método:

- 1- Desparafinar e hidratar;
- 2- Passagem em água destilada;
- 3- Corar com hematoxilina durante 2 min;
- 4- Lavar em água de torneira até azular (aprox..10 min);
- 5- Passagem rápida por água destilada;
- 6- Passagem rápida por álcool a 70%;
- 7- Corar com eosina durante 2 min; 18 8- Desidratar, diafinizar e montar.

A desidratação tem que ser directa para o álcool a 95%, dado a eosina ser uma 21 solução alcoólica.

Resultados:

Núcleosazuis
Citoplasma.....rosa/vermelhado

Protocolo utilizado no Serviço de Anatomia Patológica do H.D.V.R

Giemsa:

• Aplicações:

Método que evidencia determinados parasitas, principalmente protozoários.

Soluções:

Solução Stock:

Giemsa.....4g
Glicerol.....250ml
Metanol (p.a).....250ml

Dissolver o Giemsa no glicerol a 60°C com agitação. Adicionar o metanol 14 continuando a agitação. Adicionar o metanol continuando a agitação. Deixar 15 em repouso durante 7 dias e filtrar.

Solução de trabalho:

Solução Stock.....	4ml
Água destilada tamponada.....	96ml
Na ₂ HPO ₄ anidro.....	0,68g
KH ₂ PO ₄	0,32g
Água destilada.....	1000ml

Método:

- Desparafinar e hidratar;
- Passagem rápida por água da torneira seguida de 2 ou 3 passagens por água destilada;
- Passar por água destilada tamponada;
- Corar pela solução de trabalho e deixar durante a noite;
- Passar por água destilada;
- Tratar pelo ácido acético aa 0,5% até que os cortes adquiram tonalidade rosa;
- Passar por água;
- Secar ao ar;
- Desidratar muito rapidamente em álcoois;
- Diafanizar e montar.

Resultados:

Protozoários e outros microorganismos.....	Azul escuro
Fundo.....	Rosa/Azul pálido
Núcleos.....	Azuis

Steves (1990a)

Grocott

• Aplicações:

- Método para corar fungos é baseado no teor de glicídios que compõem a parede destes.

Soluções:

Solução Stock:

Solução aquosa de tetraborato de sódio (boráx) a 5%; 22 Solução prata
hexamina:

Solução aquosa de nitrato de prata a 5 %.....5ml

Solução aquosa de metanamina a 3%.....100ml Esta

mistura forma um precipitado branco que se dissolve posteriormente. Guarda - se
em frasco escuro, conservando -se durante bastante tempo no frigorífico a 4°C.

Solução de trabalho:

Boráx.....2ml

Água destilada.....25ml

Solução de prata -hexamina (extemporânea).....25ml

Verde brilhante.....0,2g

Ácido acético.....0,2ml

Água destilada.....500ml

Método

- 1- Desparafinar e hidratar;
- 2- Passagem rápida por água da torneira seguida de 2 ou 3 passagens por água destilada;
- 3- Oxidar em ácido crómico a 5% durante 1 h;
- 4- Lavar em água corrente;
- 5- Passagem rápida por bissulfito de sódio a 1% de forma a retirar os resíduos do ácido crómico;
- 6- Lavar em água corrente por 5 min;
- 7- Lavar em água destilada 3x;
- 8- Colocar na solução de prata hexamina pré-aquecida a 56°C durante 30-60min, até os cortes ficarem amarelo- castanho;
- 9- Lavar em água destilada \pm 6x;
- 10- Viragem em cloreto de ouro a 0,1% durante 10 min;
- 11- Passagem por água destilada;
- 12- Deixar em tiosulfato de sódio a 2% durante 2 a 5 min;
- 13- Lavagem rápida em água;

- 14- Contrastar com o verde brilhante 30seg;
- 15- Álcool a 95%;
- 16- Desidratar, diafanizar e montar em Entellan®.

Resultados:

Fungos e corpos estranhos.....preto
Swisher (2002).

PAS Mc Manaus Aplicações:

Método que evidencia particularmente, quitina de fungos e leveduras. É também utilizado na revelação das drusas características dos piogranulomas.

Soluções

Laranja G- ácido pícrico:

LaranjaG.....	1g	Ácido
pícrico (solução aquosa saturada).....	100ml	Água
sulfurosa:		
Ácido clorídrico 1/N.....	220m	
Metabissulfito de Sódio.....	1g	

Método

- 1- Desparafinar e hidratar;
- 2- Passagem rápida por água da torneira seguida de 2 ou 3 passagens por água destilada;
- 3- Ácido periódico a 1% durante 15 min;
- 4- Lavar em água destilada 5x;
- 5- Reagente Schiff 25 min;
- 6- Passagem por 3 diferentes águas sulfurosas;
- 7- Corar pela hematoxilina de Gill 2 min;
- 8- Lavar em água corrente 10 min;
- 9- Corar o citoplasma pelo Laranja G- ácido pícrico; 10- Desidratar, diafanizar e montar em Entellan®

Resultados

Quitina de fungos e leveduras.....vermelho
Magna das drusas.....vermelho
Outros tecidos.....amarelo

Behmer, Tolosa e Neto (1975)

SUPLEMENTOS UTILIZADOS¹

Gaiola	Suplementação
1	Sacarose 1:1 + albumina+ água (controle positivo)
2	Apifonda + albumina+ água
3	Sacarose 1:1 + Hibee +água
4	Sacarose1:1+Hive Alive+água
5	Sacarose1:1+Nozevit+ água
6	Sacarose1:1+Neonosapiol+água
7	Sacarose1:1+Vitafeedgold+água
8	Sacarose1:1+Apiherb+ água
9	Sacarose1:1+Antivamosem+ água
10	Sacarose1:1+Biogen Probiótico+ água
11	Sacarose1:1+Nutribee Própolis+ água
12	Sacarose1:1+Apimida+ água
13	Sacarose1:1+Promotor L 47.0 + água
14	Sacarose1:1+Startovit+ água
15	Sacarose 1:1 + albumina+ água (controle negativo)

¹Suplementos utilizados na alimentação das abelhas mantidas em gaiolas em ambiente controlado.