



Influência da suplementação alimentar na prevalência de parasitos e patógeno em colônias de *Apis mellifera* africanizada

Influence of dietary supplementation on the prevalence of parasites and pathogens in Africanized *Apis mellifera* colonies

M. M. da Costa*; E. R. Brito; J. A. dos Santos; V. C. Modesto; M. V. dos S. Lima; E. E. G. Pinheiro; L. dos S. Farias; I. P. Silva; S. M. P. C. da Silva; C. A. L. de Carvalho; G. da S. Sodré

Núcleo de Estudo dos Insetos (INSECTA), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 44380-000, Cruz das Almas-Bahia, Brasil

*costa.monteiromc@gmail.com

(Recebido em 11 de março de 2024; aceito em 24 de maio de 2024)

A pesquisa objetivou testar suplementação mineral proteica na prevalência de *Leptus* sp., *Varroa destructor* e *Vairimorpha* sp. em colônias de *Apis mellifera* africanizada. O experimento foi em Delineamento Inteiramente Casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos (exceto T1 – sem suplementação) foram elaborados à base de sacarose e água (xarope): T2- xarope; T3- complexo de aminoácidos comercial; T4- resíduo de levedura; T5- bentonita; T6- mistura resíduo de levedura e bentonita. Analisou-se a composição dos resíduos de leveduras e bentonita, consumo de alimento, peso das colônias, taxa de *Leptus* sp., *V. destructor* e níveis de microsporídeo *Vairimorpha* sp. Diferentes teores de matéria seca, material mineral e proteína bruta foram encontrados nos tratamentos T4 (20,31; 4,89; 43,55), T5 (7,55; 50,70; 4,86) e T6 (13,41; 42,86; 26,90). O consumo médio de suplemento foi 79,20% e apenas no T1 houve diferença significativa no peso das colônias (8,70 kg = inicial; 6,80 kg = final). Observou-se diferenças significativas na taxa de *V. destructor* em T2 e T3, assim como nos níveis de infecção por *Vairimorpha* sp. em ambos os tratamentos ($p \leq 0,05$). Concluiu-se que T2 e T3 aumentaram a taxa de *V. destructor* e os níveis de infecção por *Vairimorpha* sp. Os tratamentos T4, T5 e T6 não apresentaram alterações significativas nas taxas de infestação por *Leptus* sp. e *V. destructor* ou infecção por *Vairimorpha* sp. T4 apresentou níveis proteicos e minerais ideais para dieta de *A. mellifera* africanizada.

Palavras-chave: bentonita, resíduo de leveduras, *Vairimorpha*.

The research aimed to test protein mineral supplementation on the prevalence of *Leptus* sp., *Varroa destructor* and *Vairimorpha* sp. in Africanized *Apis mellifera* colonies. The experiment was in a Completely Randomized Design, with six treatments and five replications. The treatments (except T1 – without supplementation) were made with sucrose and water (syrup): T2 – syrup; T3- commercial amino acid complex; T4- yeast residue; T5- bentonite; T6- mixes yeast residue and bentonite. The composition of yeast and bentonite residues, food consumption, colony weight, rate of *Leptus* sp., *V. destructor* and levels of *Vairimorpha* sp. microsporidia were analyzed. Different levels of dry matter, mineral material and crude protein were found in treatments T4 (20.31; 4.89; 43.55), T5 (7.55; 50.70; 4.86) and T6 (13.41; 42.86; 26.90). The average supplement consumption was 79.20% and only in T1 was there a significant difference in the weight of the colonies (8.70 kg = initial; 6.80 kg = final). Significant differences were observed in the rate of *V. destructor* in T2 and T3, as well as in the levels of infection by *Vairimorpha* sp. in both treatments ($p \leq 0.05$). It is concluded that T2 and T3 increased the rate of *V. destructor* and the levels of infection by *Vairimorpha* sp. Treatments T4, T5 and T6 did not show significant changes in the rates of infestation by *Leptus* sp. and *V. destructor* or infection by *Vairimorpha* sp. T4 presented ideal protein and mineral levels for the diet of Africanized *A. mellifera*.

Key-words: bentonite, yeast residue, *Vairimorpha*.

1. INTRODUÇÃO

A adaptação de *Apis mellifera* africanizadas ao clima tropical impulsionou a apicultura no Brasil. Polinizadores generalistas, essas abelhas nutrem-se por meio de néctar, pólen e água coletados na natureza [1, 2], porém em períodos sazonais, como a entressafra ocorre escassez de flora apícola afetando o forrageamento e armazenamento de alimentos nas colmeias, consequentemente causando a diminuição do enxame [3]. Para mitigar esse problema, os apicultores recorrem à suplementação artificial, no intuito de sustentar as colônias até a próxima florada [4].

Os suplementos alimentares para abelhas podem ser energéticos e/ou proteicos [5]. Os alimentos energéticos de subsistência incluem açúcares refinados ou não refinados e tem a função de compensar a carência de néctar [6]. Em momentos de necessidade, as abelhas misturam água com açúcar (xarope), convertendo-os em açúcares simples para se alimentarem [7]. Já os alimentos proteicos, como exemplo, àqueles a base de soja e milho, são regularmente usados na suplementação das colônias durante a entressafra para compensar a restrição de pólen [8].

A qualidade, os tipos, a composição, as concentrações e o processamento de suplementos variam e geram preocupação quanto a sua eficácia [9] levando pesquisadores e apicultores estudarem essas fontes de alimentos e buscarem alternativas que atendam às exigências nutricionais das abelhas em períodos de carência de recursos [10].

Diferentes estudos utilizaram compostos bioativos probióticos e pós-bióticos obtidos a partir da microbiota intestinal das abelhas, como suplementos dietéticos no biocontrole de ectoparasitas patógenos em colônias de *A. mellifera* [11, 12]. Resíduos das agroindústrias na alimentação de insetos estão ganhando notoriedade, porém utilizando outras ordens taxonômicas. Dietas compostas por resíduos e leveduras de cerveja, bioativos ricos em proteínas, foram utilizadas no desenvolvimento das larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera [13]. Resíduos do processamento do azeite e da destilação de óleos essenciais (bagaço de azeitonas) em diferentes proporções foram testados no intuito de otimizar o valor nutricional, melhorar o crescimento e a atividade antioxidante de uma espécie de Coleoptera, destacando o potencial sustentável dos subprodutos da agroindústria nas pesquisas experimentais [14].

Resíduos, como os da produção do suco de uva, foram testados para melhoramento nutricional de larvas de Coleoptera [15] por conter compostos fenólicos, minerais e proteínas, resultantes de diferentes processos, entre eles a fermentação [16]. Nessa mesma perspectiva, resíduos da produção do hidromel, cujo processo assemelha-se a produção de vinho, também envolve várias etapas de fermentação, como a pré-fermentação e pós-fermentação [17].

De modo geral, o hidromel é obtido a partir do processo de fermentação da mistura de mel e água com adição de leveduras, principalmente, *Saccharomyces cerevisiae*, considerada probiótico [18-21]. Na fase final da fermentação, ocorrem duas etapas: trasfega do hidromel, onde são formados sedimentos ou resíduos sólidos denominados “resíduo de leveduras”; clarificação e estabilização do mosto do hidromel, onde são formados sedimentos de bentonita, uma combinação argilomineral bastante utilizada na produção de bebidas [22]. Ambos os resíduos apresentam, respectivamente, teores significativos de proteínas e sais minerais, nutrientes importantes na alimentação de insetos [15, 23, 24].

Os alimentos chamados de artificiais podem representar uma ferramenta valiosa para suplementar a dieta desses insetos, quando as fontes naturais de néctar e pólen se encontram em escassez [25]. No entanto, utilizá-los com prudência e adotar práticas apícolas apropriadas para reduzir qualquer ameaça à saúde das colônias. Os benefícios desses suplementos, assim como os impactos e sua influência na prevalência de ácaros ectoparasitas e fungos microsporídios, ainda requer esforços de pesquisa [26, 27].

Dentre os ácaros, as espécies do gênero *Leptus* são ectoparasitas que causam injúrias nas *A. mellifera*, ao perfurar suas cutículas para se alimentarem, resultando em abelhas menores [28]. A espécie *Varroa destructor*, que também é um ectoparasita, alimenta-se da hemolinfa e tecido adiposo das larvas, prejudica a resposta imune e armazenamento de nutrientes [29-31]. Além disso, *V. destructor* é vetor de vírus patogênicos, como o DWV (Deformed Wing Virus), que desencadeia uma má formação nas asas além de diminuir a longevidade das abelhas, podendo levar ao declínio das colônias [32].

Dentre os fungos, o microsporídio do gênero *Vairimorpha* causa doenças em colônias de *A. mellifera*, resultando em problemas digestivos, desnutrição e redução na vida útil das abelhas infectadas [33]. Os efeitos desses parasitos e patógeno nas colônias variam de acordo com a localização geográfica, taxa de infestação e espécies de microsporídio envolvidos [34]. Portanto é de suma importância monitorar o estado nutricional das abelhas.

Considerando que a produção de hidromel faz parte da cadeia do negócio apícola e que gera resíduos com potencial proteico e mineral, que são normalmente descartados pela agroindústria, foi realizada a avaliação desses resíduos como potenciais pós-bióticos na dieta suplementar de *A. mellifera* africanizada. Nesse contexto, esta pesquisa foi conduzida com o propósito de testar os efeitos da suplementação mineral proteica, a partir de resíduos do hidromel, na infestação por *Leptus* sp. e *Varroa destructor*, e na infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. nas colônias de *A. mellifera* africanizada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo e desenho experimental

A pesquisa foi conduzida no apiário localizado na Fazenda Experimental de Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) (12°39'19.2"S; 39°04'58.3"W; 220 metros de altitude) e no Núcleo de Estudo dos Insetos (Insecta) (12°39'36.0"S; 39°05'08.0"W; 220 metros de altitude), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Brasil.

Foram utilizadas 30 colônias de *A. mellifera* africanizada, capturadas em ambiente urbano e suburbano. As colônias de *A. mellifera* africanizada foram instaladas em colmeias (núcleos) padrão Langstroth, com cinco quadros identificados com etiquetas contendo números (quadro) e letras (lado do quadro) para melhor controle do manejo. A idade e genética das rainhas selvagens eram desconhecidas, ou seja, não houve controle da idade e da genética das rainhas nesse experimento. Foi adotado o Delineamento experimental Inteiramente Casualizado (DIC) com seis tratamentos e cinco repetições.

Levando em consideração o ciclo de desenvolvimento das abelhas operárias (ovo-adulto \approx 16 – 24 dias), assim como a idade em que executam a primeira viagem de coleta (\approx 18 – 26 dias) [35-37], a avaliação foi realizada durante oito semanas (tempo de alimentação das colônias com os tratamentos). Esse intervalo permitiu observar diferentes fases do ciclo de vida das abelhas, observar as taxas de infestação dos ácaros e avaliar o impacto na saúde das colônias.

Optou-se por realizar o estudo em ambiente natural devido à sua proximidade com a realidade ecológica desses insetos. Ambientes controlados têm vantagens como o estudo isolado de variáveis específicas, porém podem não capturar totalmente a complexidade do ambiente natural. Testes em ambientes naturais são importantes para compreender as interações com o meio incluindo competição por recursos e adaptações comportamentais frente a agentes estressores como predadores e doenças.

2.2 Procedimentos para o preparo dos tratamentos suplementares

2.2.1 Análises bromatológicas do resíduo de leveduras e da bentonita

As análises bromatológicas das amostras do resíduo de leveduras e da bentonita foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Bromatologia do CCAAB/UFRB. As amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada por 72 horas a 55°C. Posteriormente foram submetidas às análises para determinação da matéria seca (MS; método 967.03), material mineral (MM; método 942.05), e proteína bruta (PB; método 981.10), conforme AOAC (1977) [38]. As amostras foram moídas em moinho de facas tipo *Wiley* com peneira de 1mm, pesadas em balança de precisão, armazenadas em microtubos tipo *ependorf* e identificadas de acordo com cada tratamento.

2.2.2 Formulação dos tratamentos

Os ingredientes para o preparo do xarope utilizado como base para compor os tratamentos suplementados foram: açúcar comum e água potável, na proporção 1:1.

Os seis tratamentos consistiram em: T1 – tratamento controle (alimentação natural forrageada pelas abelhas); T2 – xarope (1L), suplemento energético amplamente utilizado na apicultura; T3 – xarope com adição do complexo de aminoácidos comercial (1mL.L⁻¹), conhecido como promotor de crescimento para enxames (CAC - suplemento vitamínico com nove aminoácidos, da marca HIPRA – Equilibrium®); T4 – xarope com adição do resíduo de leveduras (1g.L⁻¹), proveniente do processo de fabricação do hidromel; T5 – xarope com adição do resíduo de bentonita (1g.L⁻¹), proveniente do processo de fabricação do hidromel; T6 – xarope com adição da mistura resíduos de leveduras e de bentonita (1g.L⁻¹), proveniente do processo de fabricação do hidromel. Os resíduos de leveduras e de bentonita foram provindos de doação da “San’Mielle Hidromelaria”. É importante ressaltar que durante todo o período em que as colônias estavam sob suplementação, as mesmas tinham acesso livre ao ambiente aberto para forragear.

2.2.3 Fornecimento e avaliação do consumo nos tratamentos

Após preparo, o xarope com e sem suplemento referente a cada tratamento, foi armazenado em embalagem plástica (saco plástico em rolo, para alimentos). As embalagens contendo os tratamentos foram transportadas ao apiário, em seguida colocados em alimentadores (utilizou-se bandejas plásticas, retangulares, transparentes com uma fina camada de cera apícola na parte interna). Cada conjunto formado pelo alimentador (peso médio = 21,19g) e alimento foi pesado individualmente em balança digital (marca SF-400, precisão eletrônica de 1g a 10 kg) para se obter o peso inicial do alimento (por colônia). Em seguida, o alimentador foi acomodado na parte superior dos quadros e perfurado para liberação do conteúdo. Para evitar eventuais afogamentos das abelhas no xarope, além da camada de cera nas bandejas, foram colocados flutuadores (cinco palitos de madeira, do tipo picolé) em todos os alimentadores. Na primeira semana da intervenção dos suplementos artificiais, as colônias (exceto do T1 - controle) receberam seus respectivos tratamentos. Esse procedimento foi repetido semanalmente, onde essas colônias foram alimentadas, simultaneamente, em período diurno. O conjunto formado pelo alimentador e alimento restante foi pesado para se determinar a taxa de consumo semanal (peso inicial - peso final) de cada colônia. A quantidade de alimento consumida em cada semana foi somada para se obter o consumo total de alimento por colônia durante o período experimental. As sobras de alimento (quando houve) foram armazenadas em baldes com tampas e encaminhadas para descarte em Laboratório, de forma a evitar possíveis saques pelas abelhas das outras colônias (Figura 1).

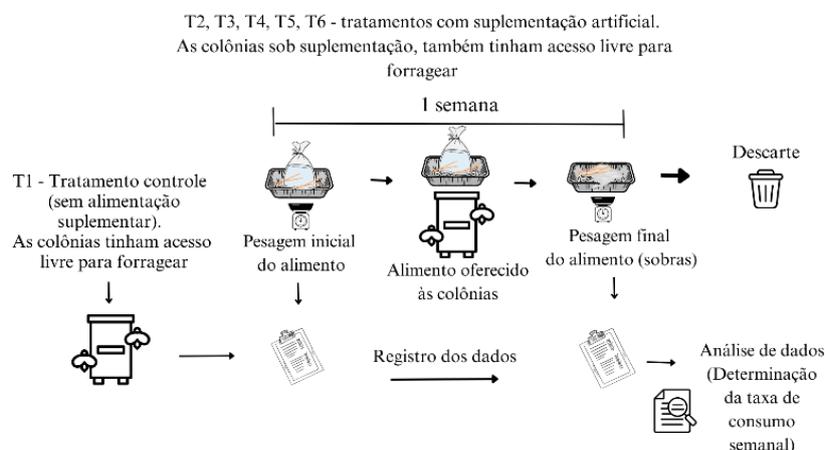


Figura 1: Esquema do procedimento para fornecimento e avaliação (pesagem) do consumo suplementar (tratamentos) das colônias *Apis mellifera* para se determinar a taxa de consumo semanal dos tratamentos (peso inicial-peso final) de cada colônia. Fonte: os autores, 2024.

2.3 Pesagem das colônias

Para se obter os valores das variáveis de peso das colônias, foi realizada a pesagem de todas as colônias antes (peso inicial) e depois (peso final) da intervenção dos tratamentos. Utilizou-se balança digital (marca U4home, modelo 2005D; vidro temperado; capacidade máxima de 150kg de alta precisão). A mensuração do peso das colônias foi obtida pela diferença entre o peso inicial e o peso final, das colônias, baseando-se nos métodos utilizados por Lefebvre e Pierre (2006) [39] e Human et al. (2013) [40]. Considerando as particularidades do cenário, foram realizadas modificações ou ajustes (tipo de balança utilizada, etc.), para tornar a metodologia mais adequada à pesquisa em questão. Os dados foram tabulados e submetidos as análises estatísticas.

2.4 Coleta de amostras nas colônias

Amostras contendo aproximadamente 300 operárias foram coletadas de cada colônia, antes e após a intervenção da suplementação alimentar e foram mantidas em álcool 70% em freezer à 80°C para as análises das taxas de infestação por *Leptus* sp. e por *V. destructor*, e dos níveis de infecção por *Varimorphora* sp. As análises foram realizadas no Laboratório de Morfometria e da Saúde das Abelhas do Núcleo de Estudo dos Insetos - Insecta/CCAAB/UFRB.

As abelhas foram coletas com autorização concedida pelo SISBIO, de acordo com o art. 28 da IN 03/2014: número: 87442-1. Expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Código de autenticação: 0874420120230720.

2.5 Determinação da infestação por ácaros *Leptus* sp. e *Varroa destructor*

As análises para avaliar os índices de infestação dos ácaros *Leptus* sp. e *V. destructor* foram realizadas nos Laboratórios de Morfometria e da Saúde das Abelhas, do Insecta/CCAAB/UFRB, seguindo a metodologia de Dietemann et al. (2013) [41]. As abelhas de cada amostras foram colocadas em peneira para remoção do álcool 70%. Uma bandeja plástica foi utilizada para contagem e separação dos ácaros. Com ajuda de pinças cirúrgicas, os ácaros foram retirados dos corpos das abelhas, contados e registrados. Após todo procedimento as amostras de ácaros e abelhas foram depositadas, separadamente, em microtubos tipo *ependorf* e tubos tipo Falcon, e armazenados em freezer -80°C.

Para mensurar a taxa de infestação de ácaros (*Leptus* sp. e *V. destructor*) em abelhas (adultas) nas colônias estudadas foi utilizado a equação 1.

$$TIA_v = \frac{N_A}{N_B} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde,

TIA = taxa de infestação do ácaro;

v = *Varroa*;

l = *Leptus*;

NA = número de ácaros encontrados;

NB = número de abelhas

2.6 Determinação dos níveis de infecção por *Vairimorpha* sp.

Para a determinação de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp., nas colônias, seguiu-se a metodologia proposta por Human et al. (2013) [40]. Abdômens de 30 abelhas (de cada amostra) foram retirados e macerados em almofariz (cadinho e pistilo) até formar uma pasta, posteriormente foi adicionado 30 mL de água destilada (1mL/por abelha). A mistura foi homogeneizada e filtrada em manta de *voil*. Uma alíquota de 10µL do homogeneizado foi colocada em cada lado da câmara do Neubauer e, após 2 minutos, foi realizada a contagem do número de esporos em microscópio óptico (marca Olympus®) com ampliação de 400x.

Após a contagem dos esporos de *Vairimorpha* sp., aplicou-se a equação 2 para calcular o número de esporos por abelha e assim determinar o nível de infecção.

$$Z = \left(\frac{\alpha}{\beta} \right) \cdot \delta \cdot 250.000 = n \quad (2)$$

Onde,

Z = Número de esporos por abelhas;

A = Números de esporos contados;

β = Números de quadrados contados;

δ = Fator de diluição (se houver)

n = nº de esporos por mL

O nível de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp., foi determinado conforme a tabela proposta por Jaycox e Parise (1980) [42], adaptada por Calderón-Fallas e Moreno-Morales (2022) [43] que classifica os níveis e intensidade de infecção (número de esporos/abelhas) da doença nose-mose em abelhas (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos níveis de infecção, intensidade e quantidade de esporos/abelhas (mL) de microsporídio *Vairimorpha* sp.

Nível de infecção	Intensidade	Quantidade de esporos(mL)
Nulo	0	Menos de 10.000
Muito leve	1	10.000 - 1.000.000
Leve	2	1.000.001 - 5.000.000
Moderado	3	5.000.001 a 10.000.000
Semiforte	4	10.000.001 a 20.000.000
Forte	5	Acima de 20.000.000

Fonte: Calderón-Fallas e Moreno-Morales (2022) [43].

Para se obter a porcentagem de colônias, dentro de cada tratamento (antes e depois) em relação ao nível de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. foi aplicada a equação 3.

$$N_{ir} = \frac{N_i}{N_t} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde,

N_{ir} = Níveis de infecção relativa

N_i = Níveis de infecção individual

N_t = Níveis de infecção total

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos às análises estatísticas utilizando o software R® v.4.2.3 [44], adotando um nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todas as análises realizadas. Inicialmente foram testados os pressupostos para realização da Análise de Variância (ANOVA), aplicando o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos resíduos e, o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias, utilizando o pacote “car” [45].

Os dados que não atenderam aos pressupostos foram submetidos às transformações. Deste modo, os valores referentes ao nível de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp., foram transformados pelo método de Box-Cox [46] com adição da constante 0,5 em todos os valores [47]. Os dados de taxa de infestação *V. destructor*, foram submetidos a transformação logarítmica (Log(x+10)) [48]. Os dados de consumo de alimento foram submetidos a uma análise exploratória para identificação de outliers utilizando a função “*identify_outliers*” do pacote “rstatix” [49]. Os

outliers identificados foram removidos das análises, a fim de garantir que os dados atendessem aos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias.

A variável consumo total de alimento foi analisada por meio da ANOVA para testar a hipótese nula de que o consumo total foi igual em todos os tratamentos, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Para as variáveis peso da colônia, infestação por *V. destructor* e infecção por *Vairimorpha* sp., foi aplicada ANOVA, para testar a hipótese nula de que os tratamentos apresentaram médias iguais para cada variável analisada antes e após a intervenção, quando rejeitada a hipótese nula aplicou-se o teste *post-hoc* de Tukey. ANOVA e o teste de Tukey foram aplicados utilizando o pacote “ExpDes.pt” [50]. Os dados de peso da colônia, infestação por *V. destructor* e infecção por *Vairimorpha* sp., foram submetidos também ao teste T pareado em cada tratamento individualmente, para testar a hipótese nula de que não houve alterações nas médias das variáveis estudadas após a intervenção da suplementação alimentar.

Os valores da variável infestação por *Leptus* sp., não se adequaram aos pressupostos da ANOVA mesmo após tentativas de transformações. Deste modo, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese nula de que a mediana da taxa de infestação antes e após a intervenção é igual entre os tratamentos. Posteriormente, foi aplicado aos mesmos dados o teste de Wilcoxon para dados pareados, a fim de testar a hipótese nula de que não houve alteração na taxa de infestação após a intervenção em cada tratamento, ambos os testes foram realizados utilizando o pacote “rstatix” [49].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises bromatológicas do resíduo de leveduras e da bentonita

Os resultados bromatológicos demonstraram que a amostra do resíduo de leveduras apresentou 20,31% de matéria seca (MS), 4,89% de material mineral (MM) e 43,55% de proteína bruta (PB). Para amostra de bentonita, o teor de MS foi 7,55%, de MM foi 50,70% e de PB, 4,86%. Para a amostra da mistura resíduo de leveduras e bentonita, o teor de MS foi 13,41%, de MM foi 42,86% e PB, 26,90% (Tabela 2).

Tabela 2: Composição bromatológica do resíduo de leveduras, da bentonita e da mistura resíduo de levedura e bentonita, em percentagem.

Item	Resultados da Análise bromatológica (%)		
	Resíduo de leveduras	Bentonita	Resíduo de leveduras + Bentonita
MS	20,31	7,55	13,41
MM	4,89	50,70	42,86
PB	43,55	4,86	26,90

Onde: MS = matéria seca; MM = material mineral; PB = proteína bruta.

O teor de proteína bruta (PB) nas amostras de resíduo de leveduras (43,55%) superou o percentual presente no pólen (\approx 23-30%), considerado ótimo para o desenvolvimento bem-sucedido das crias [51]. O percentual de proteína dentro da faixa de 23 a 50% administrado na dieta das abelhas, principalmente das nutrízes, assegura o crescimento e secreção das suas glândulas hipofaríngeas, cuja função é a síntese de geleia real, alimento essencial às larvas das futuras rainhas [52]. No âmbito científico, o teor ideal de material mineral indicado à dieta das abelhas ainda não foi consolidado, porém, os resultados da análise bromatológica para o teor de MM no resíduo de leveduras (4,89%), utilizado nessa pesquisa, foram condizentes com pesquisas anteriores que atestaram que teores de minerais entre 1 a 5% incluídos na dieta das abelhas influenciam as atividades de enzimas antioxidantes, que protegem as células contra danos causados pelos radicais livres [53, 54]. Teores adequados de minerais como Zinco (Zn) e Cobre (Cu) influenciam positivamente a qualidade nutricional da geleia real [54, 55]. Outros minerais

como Sódio (Na), Potássio (K) e Cálcio (Ca) também influenciam no desempenho das operárias nas atividades de puxadas de células de crias até a sua operculação (cria selada) [53]. Deste modo, dieta natural (pólen e néctar) com teores de minerais abaixo de 0,5% é considerada insuficiente para suprir as necessidades nutricionais, sendo sugerido suplemento mineral adicional na dieta artificial das abelhas [53, 54].

O resultado bromatológico para o teor de PB da amostra de bentonita (4,86%) apresentou valor abaixo do recomendado ($\approx 20-30\%$) para a nutrição das abelhas, enquanto o resultado para MM foi de 50,70%. De Sousa et al. (2022) [56] consideraram que os minerais são importantes para o metabolismo das abelhas, cujas principais fontes de nutrientes são o pólen floral e o néctar. Porém, esses autores salientaram que níveis elevados de minerais podem ser prejudiciais para esses insetos, tanto imaturos quanto adultos.

Embora, o resultado bromatológico para a amostra resíduo de leveduras + bentonita tenha indicado o teor para PB (26,90), adequado para uso na alimentação suplementar [51, 52], o resultado para MM (42,86) dessa combinação apresentou teor elevado [53], que pode causar rejeição ao alimento devido ao sabor não palatável às abelhas [52, 57]. Em estudos realizados com dietas em soluções de sacarose com adição de minerais, comuns no pólen, as abelhas demonstraram a capacidade de regular a ingestão desses minerais, evitando concentrações elevadas e tóxicas [58-60].

Herbert Jr. e Shimanuki (2015) [53] compararam diferentes tratamentos nos quais as abelhas alimentadas com dieta contendo 8% de cinzas (presentes no pólen) produziram menos crias até o estágio de pupa do que aquelas alimentadas com teor abaixo de 6% de cinzas. Esses autores sugeriram que alimentos com baixos teores desse micronutriente são mais atrativos às abelhas e que embora os minerais não sejam essenciais para o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas, importante para o crescimento da colônia, a área de crias aumentou com esses teores ótimos de cinzas na dieta.

Em suma, os minerais encontrados no néctar provavelmente têm funções relacionadas ao paladar, atraindo certos polinizadores em baixas concentrações e repelindo em concentrações mais altas [61]. Essa relação com a palatabilidade pode influenciar também nos tipos de dietas utilizadas como suplementação para abelhas.

3.2 Avaliação do consumo dos suplementos e peso das colônias

As colônias estudadas consumiram em média 79,20% do alimento fornecido durante todo o experimento. De acordo com as observações durante o manejo semanal no apiário, a suplementação fornecida foi consumida em aproximadamente três dias e nenhuma perda de colônia ocorreu durante o experimento. Houve diferença significativa no consumo de alimento entre os tratamentos ($F_{(4,18)} = 9,556; p < 0,01$). A média de consumo total das colônias pertencentes aos tratamentos T2 (9,75kg) e T3 (9,83kg), foi significativamente superior às médias dos tratamentos T4 (9,49kg), T5 (9,47kg) e T6 (9,45kg) de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância (Figura 2A). Não houve diferença significativa no peso das colônias entre todos os tratamentos, antes da intervenção ($F_{(5,23)} = 0,510; p = 0,765$) ou depois da intervenção ($F_{(5,23)} = 1,959; p = 0,123$), de acordo com o teste F da ANOVA. No entanto, quando aplicado o teste T pareado aos valores de peso da colônia antes e depois da intervenção, em cada tratamento individualmente, apenas o T1 apresentou redução de peso significativa ($t = 5,447; gl = 3; p = 0,012$) apresentando peso médio inicial = 8,70kg e peso final = 6,80 kg (Figura 2B).

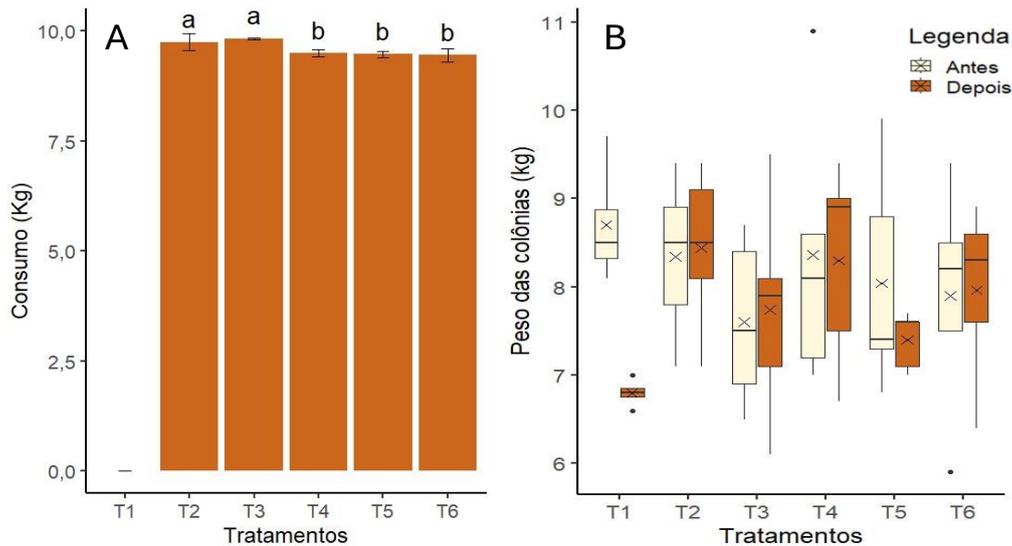


Figura 2: Média de consumo total (kg) do alimento em cada tratamento (A); peso das colônias de *Apis mellifera*, antes e depois da intervenção dos tratamentos (B). Barras seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância; onde: T1 – controle; T2 – xarope; T3 – xarope com adição do complexo de aminoácidos comercial; T4 – xarope com adição do resíduo de leveduras; T5 – xarope com adição da bentonita; T6 – xarope com adição da mistura resíduo de leveduras e bentonita. O “X” no interior do box-plot representa a média de cada tratamento.

Habitualmente, os apicultores oferecem, como alimento suplementar, xarope à base de açúcar e água, para suas colônias. Nesse sentido, o resultado obtido para a dieta T2 era esperado, uma vez que esse suplemento energético (xarope), rico em sacarose e rapidamente convertido em frutose e glicose, possui boa palatabilidade e é bem aceito pelas abelhas [62].

De forma semelhante, o consumo do T3 pelas colônias, (xarope + CAC) foi maior. Esse resultado pode estar relacionado a maior solubilidade do CAC, uma vez que os resíduos provenientes da produção do hidromel, presentes nos T4, T5 e T6 são menos solúveis [63, 64]. Após serem diluídos ao xarope, parte dos resíduos de leveduras e bentonita (T4, T5, T6) pode ter decantado antes do consumo pelas abelhas. Alguns autores sugeriram que os suplementos moídos (em pó) devem possuir características semelhantes à farinha de trigo, para evitar problemas de dissolução no preparo das dietas e facilitar a absorção do alimento pelas abelhas [65, 66]. Contudo, é importante esclarecer que a decantação mencionada, dos resíduos utilizados (leveduras e bentonita), na presente pesquisa, não ocorreu no momento do preparo dos suplementos, havendo homogeneização de todos os ingredientes utilizados como tratamento até o momento da oferta às colônias.

Como os tratamentos utilizados nesta pesquisa tinham o xarope como base para a elaboração dos suplementos (com exceção do T1, sem suplemento) e nenhum dos tratamentos com suplementação foi rejeitado, sugere-se que a suposta preferência das colônias pelo tratamento T3 se deve somente à combinação e boa diluição do CAC com glicose e frutose contidas no xarope. Esse fato também foi sugerido por Castagnino et al. (2006) [67] e Castagnino et al. (2022) [68], que não observaram impacto superior no crescimento das colônias com o uso do CAC, em comparação com aquelas que receberam apenas xarope, atribuindo os benefícios observados principalmente ao xarope e não ao CAC.

Quanto a redução de peso das colônias do T1 (controle) pode estar relacionada com a redução da disponibilidade de néctar e pólen no período da realização da pesquisa. De acordo com Puškadija et al. (2017) [69], a falta de suplementação e a oferta de flora apícola reduzida causam uma diminuição significativa na ingestão de pólen pelas abelhas, sendo necessário o consumo do pólen armazenado (pão de abelha), o que ocasiona redução no peso, no tempo de vida das operárias, produção insuficiente de geleia real necessária para o desenvolvimento sadio das larvas,

diminuição na postura, portanto menos crias, resultando em colônias menos populosas e, conseqüentemente, com menor peso.

3.3 Taxas de infestação por ácaros *Leptus* sp. e *Varroa destructor*

Os resultados para as taxas de infestação por ácaro *Leptus* sp. não foram significativos, entre todos os tratamentos antes da intervenção (KW = 3,943; gl = 5; $p = 0,558$) ou depois da intervenção (KW= 5,388; gl = 5; $p = 0,370$) no período experimental, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Além disso, ao aplicar o teste de Wilcoxon, para comparar a diferença da taxa de infestação de cada tratamento individualmente antes e após a intervenção, também não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos. Isso sugere que a taxa de infestação por *Leptus* sp., permaneceu constante em todos os tratamentos (Figura 3).

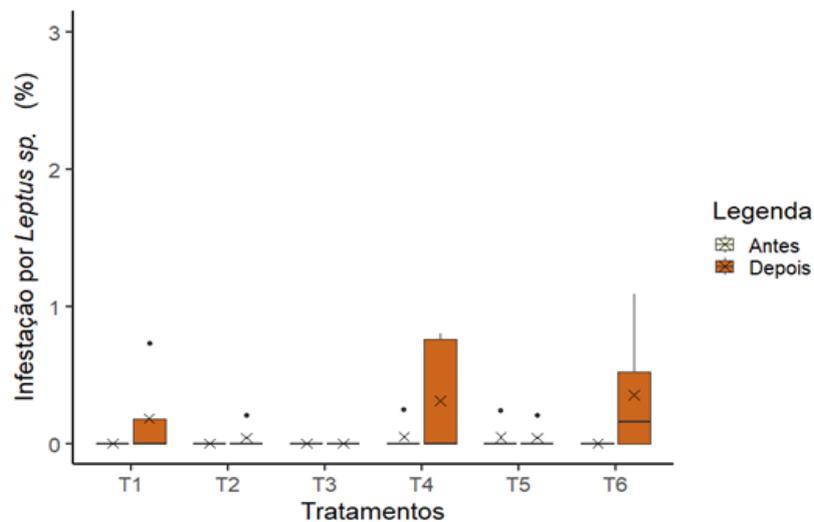


Figura 3: Taxa de infestação por *Leptus* sp., antes e depois a intervenção dos tratamentos nas colônias de *Apis mellifera*, usadas no experimento. O “X” no interior do box-plot representa a média de cada tratamento.

O resultado não significativo para o nível de infestação por ácaros *Leptus* sp., nas colônias examinadas pode ser atribuído a dois fatores: primeiro, o comportamento peculiar desses ectoparasitas, que ovopositam no solo ou nas folhas das plantas [70]. Após a eclosão, as larvas aguardam a chegada do hospedeiro, neste caso as abelhas, enquanto elas coletam alimentos. Em segundo lugar, o período do ano e a menor intensidade de forrageamento reduz a interação entre abelhas, ácaros e patógenos [71].

A taxa de infestação por *V. destructor* considerando todos os tratamentos antes da intervenção com os suplementos variou entre 0% e 3,49%. As médias em cada tratamento não diferiram estatisticamente entre si ($F_{(5,23)} = 1,233$; $p = 0,326$) pelo teste F da ANOVA. No final do período experimental o nível de infestação em todos os tratamentos variou entre 0% e 6,37% e também as médias não diferiram estatisticamente entre si ($F_{(5,23)} = 0,777$; $p = 0,576$) pelo teste F da ANOVA. As variações do nível de infestação por *V. destructor* em cada tratamento individualmente, antes e depois da intervenção com os suplementos, foram significativas pelo teste T pareado apenas nos tratamentos T2 ($t = -4,543$; gl = 4; $p = 0,01$) e T3 ($t = -3,048$; gl = 4; $p = 0,038$) (Figura 4).

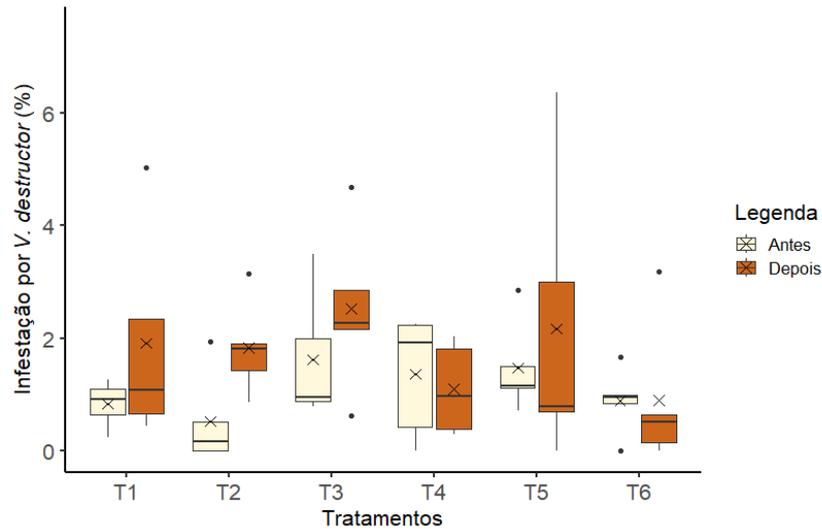


Figura 4: Taxa de infestação por *Varroa destructor* antes e depois da intervenção dos tratamentos nas colônias de *Apis mellifera*, usadas no experimento. O “X” no interior do box-plot representa a média de cada tratamento.

Embora em outros países o limite aceitável para populações de *V. destructor* nas colônias varia de 5% a 12% [72], não há consenso para as *A. mellifera* africanizada no Brasil. Contudo, com base nos valores de outros países, os níveis de infestação por *V. destructor* encontrados nas colônias dos tratamentos T1 (5,026%) e T5 (6,373%) podem requerer atenção e alerta de risco para a saúde das abelhas [73]. Apesar disso, após a intervenção dos tratamentos, o nível médio de infestação por *V. destructor* foi de 1,71% nas colônias estudadas.

3.4 Níveis de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp.

O número médio de esporos por abelha do microsporídio *Vairimorpha* sp. em todas as colônias antes da intervenção dos tratamentos esteve entre 0 (nível de infecção: nulo) e 7.716.667,00 (nível de infecção: moderado). Após a intervenção dos tratamentos o número médio de esporos por abelhas, em todas as colônias ficou entre 0 (nível de infecção: nulo) e 10.733.333,33 (nível de infecção: semiforte). A infecção por *Vairimorpha* sp. entre os tratamentos antes da intervenção, não diferiram estatisticamente entre si ($F_{(5,23)} = 0,724$; $p = 0,613$). Após o período experimental, os níveis de infecção também não foram significantes entre os tratamentos ($F_{(5,23)} = 1,459$; $p = 0,242$). Porém, de acordo com o teste T pareado os resultados indicaram alterações significativas nos níveis de infecção dos tratamentos T2 ($t = -3,970$, $gl = 4$; $p = 0,017$) e T3 ($t = -3,755$, $gl = 4$; $p = 0,020$) após a intervenção, sugerindo aumento no número médio de esporos por abelhas nas amostras das colônias submetidas aos respectivos tratamentos (Figura 5).

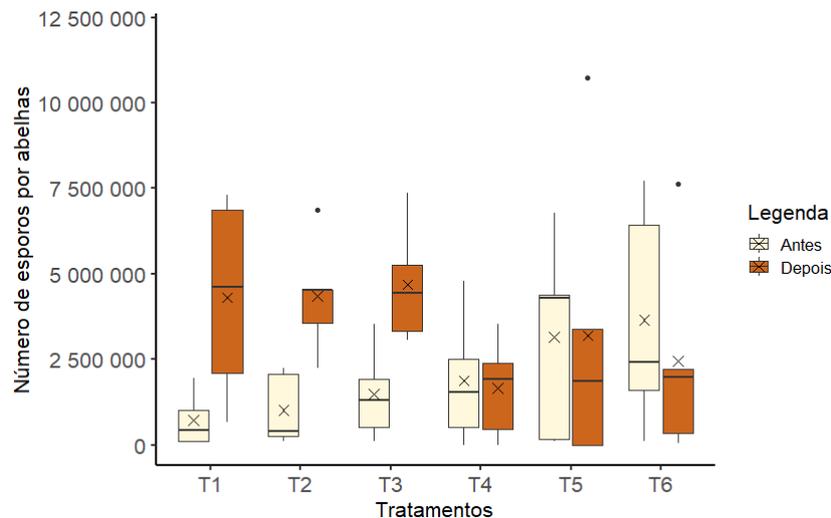


Figura 5. O número médio de esporos por abelha, do microsporídio *Vairimorpha* sp. antes e depois da intervenção dos tratamentos nas colônias de *Apis mellifera* usadas no experimento. O “X” no interior do box-plot representa a média de cada tratamento.

Independentemente dos tratamentos utilizados, houve oscilação quanto a classificação do nível de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. [43] em quase todas as colônias. No tratamento controle (T1), 75% das colônias passaram do nível "muito leve" para o nível "leve" após o período de intervenção. Das colônias suplementadas com o “T2”, antes da intervenção, 60% estavam com nível “muito leve” e 40% nível “leve”, de infecção; porém, essas percentagens mudaram para 80% no nível “leve” e 20% no nível “moderado” após a intervenção dos tratamentos. No “T3”, colônias que estavam nos níveis “muito leve” (40%) e “leve” (60%) passaram a apresentar nível “leve” (80%) e nível “moderado” (20%) de infecção. Após a intervenção dos tratamentos, “T5” apresentou 40% das colônias no nível “nulo”, 40% no nível e “leve” 20% no nível “semiforte”, enquanto que “T6”, apresentou 40% das colônias no nível “muito leve”, 40% “leve” e 20% nível “moderado” de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp.

Dos seis tratamentos utilizados, somente em “T4”, a classificação do nível de infecção permaneceu inalterada, apresentando 20% das colônias no nível “nulo”, 20% no nível “muito leve” e 60% no nível “leve”, antes e depois da intervenção dos tratamentos. As oscilações nas percentagens de colônias quanto ao nível de infecção, antes e depois da intervenção dos tratamentos podem ser visualizadas na Figura 6.



Figura 6: Percentagem de colônias *Apis mellifera* e seus respectivos níveis de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. antes e depois da intervenção dos tratamentos.

O nível “moderado” de infecção apresentado no gráfico, correspondente às colônias tratadas com xarope (T2) e xarope com adição do CAC (T3), não sugere a presença da nosemose, doença que causa perdas significativas de colônias [43], porém o número médio de esporos/abelhas aumentou consideravelmente em relação as colônias submetidas aos demais suplementos. Essa alteração, no nível de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. pode estar relacionada ao fato dos esporos sobreviverem por mais tempo em xarope (sacarose), como observado por Gage et al. (2018) [74] e Macinnis et al. (2022) [75] que confirmaram a presença de esporos ativos nos xaropes utilizados como alimentação energética, aumentando o risco das abelhas se afogarem ou, acidentalmente, serem esmagadas durante o manejo, caindo nessa solução, liberando esporos e potencialmente infectando múltiplas colônias. Abelhas forrageadoras de colônias alimentadas somente com xarope e que já estejam infectadas por *Vairimorpha* sp. sentem mais fome, gastam mais energia, na busca por recursos e retornam às colônias com deficiência energética [33].

Em experimento testando o estresse energético em colônias de *A. mellifera* tratadas com xarope puro e com adição do promotor de crescimento, demonstrou uma relação de competição patógeno-hospedeiro por nutrientes, resultando em aumento na contagem de esporos por abelhas, em comparação com outros tratamentos e apresentando nível “forte” de infecção [76]. Estudo semelhante, conduzido por Higes et al. 2011 [77] constatou que colônias submetidas ao tratamento de xarope com adição do complexo de aminoácidos (CAC) apresentaram maior número de esporos/abelhas em relação aos outros tratamentos utilizados, correspondendo ao nível “forte” de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp.

Por outro lado, todas as colônias tratadas com (T4), nas mesmas condições de campo, que as demais colônias, se mantiveram nos níveis de baixa intensidade (0 – 2) representando menor número de esporos/abelhas [43]. Esse resultado pode ser atribuído as propriedades nutricionais encontradas no resíduo de leveduras utilizado para compor esse tratamento, que também se apresentou como potencial pós-biótico na alimentação para abelhas. Estudo realizado por García-Vicente et al. (2023) [78] em colônias suplementadas com pós-bióticos adicionados ao xarope melhorou notavelmente a saúde nutricional das colônias, refletindo na menor infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. e aumento da população de operárias, mesmo em colônias inicialmente menores. Além disso, relatam que, os resultados com pós-bióticos foram superiores aos outros tratamentos utilizando probióticos na alimentação suplementar de *A. mellifera*. Logo, enquanto os xaropes oferecem energia rápida, a suplementação proteico energética oferece maior concentração de nutrientes, equilibrando as demandas energéticas das colônias e fornecendo nutrientes necessários para sua defesa contra a infecção [6, 8].

Embora os níveis de infecção por microsporídio *Vairimorpha* sp. encontrados nas colônias utilizadas nessa pesquisa não tenham sido críticos (forte) na quantidade de esporos/abelha, a importância de medidas preventivas para proteger as colônias, principalmente, nos períodos que necessitam de suplementação, é crucial. Nesse sentido, o monitoramento constante dos níveis de infecção desse microsporídio e do estado nutricional das colônias podem ser importantes ferramentas para a promoção sustentável da criação racional de abelhas.

4. CONCLUSÃO

Os tratamentos com xarope (T2) e com o complexo de aminoácidos comercial (T3) aumentaram a taxa de infestação de *V. destructor* e os níveis de infecção por *Vairimorpha* sp. Os tratamentos à base de xarope com adição de resíduo de leveduras (T4), xarope com adição de bentonita (T5) e xarope com a mistura resíduo de levedura e bentonita (T6), resíduos da fabricação do hidromel, não apresentaram efeitos consistentes na prevalência de *V. destructor*, *Leptus* sp. ou *Vairimorpha* sp. O “T4” destacou-se devido aos baixos níveis de infestação e de infecção e a sua composição de proteínas e minerais, sugerindo viabilidade para uso do resíduo da fabricação do hidromel na dieta de *A. mellifera* africanizada.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processos 406973/2021-0 e 305950/2021-5) e a San’Mielle Hidromelaria pela doação dos resíduos da fabricação do hidromel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calfee E, Agra MN, Palacio MA, Ramírez SR, Coop G. Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas. *PLoS Genetics*. 2020 Oct;16(10):e1009038. doi: 10.1371/journal.pgen.1009038
2. Bakour M, Fernandes Â, Barros L, Sokovic M, Ferreira. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *Lwt*. 2019 Jul;109:276-82. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.008
3. Paiva JPLM, Esposito E, De Souza GIMH, Franco TM, Morais MM. Effects of ensiling on the quality of protein supplements for honey bees *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2019 Jun;50:414-24. doi: 10.1007/s13592-019-00661-4
4. Dequenne I, Philippart de Foy JM, Cani PD. Developing strategies to help bee colony resilience in changing environments. *Animals*. 2022 Dec;12(23):3396. doi: 10.3390/ani12233396
5. Topal E, Märgäoan R, Bay V, Takma Ç, Yücel B, Oskay D, et al. The effect of supplementary feeding with different pollens in autumn on colony development under natural environment and in vitro lifespan of honey bees. *Insects*. 2022 Jun;13(7):588. doi: 10.3390/insects13070588
6. Bortolotti L, Pošćić F, Bogo G. Comparison of different pollen substitutes for the feeding of laboratory reared bumble bee (*Bombus terrestris*) colonies. *J Apic Sci*. 2020 Jul;64(1):91-104. doi: 10.2478/jas-2020-0013
7. Kumari I, Hajam YA, Thiyagarajan K, Giri A, Kumar R. Evaluation of antioxidant and antibacterial potential of honey produced from stimulative diet fed bee colonies. *Discov Sustain*. 2023 May;4(1):21. doi: 10.1007/s43621-023-00135-9
8. Tsuruda JM, Chakrabarti P, Sagili RR. Honey bee nutrition. *Vet Clin: Food Anim Pract*. 2021 Nov;37(3):505-19. doi: 10.1016/j.cvfa.2021.06.006
9. Frizzera D, Del Fabbro S, Ortis G, Zanni V, Bortolomeazzi R, Nazzi F, et al. Possible side effects of sugar supplementary nutrition on honey bee health. *Apidologie*. 2020 Mar;51:594-608. doi: 10.1007/s13592-020-00745-6
10. Decourtye A, Alaux C, Le Conte Y, Henry M. Toward the protection of bees and pollination under global change: present and future perspectives in a challenging applied science. *Curr Opin Insect Sci*. 2019 Oct;35:123-31. doi: 10.1016/j.cois.2019.07.008
11. Tejerina MR, Benítez-Ahrendts MR, Audisio MC. *Lactobacillus salivarius* A3iob reduces the incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* sp. in commercial apiaries located in the northwest of Argentina. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2020 Mar;12:1360-9. doi: 10.1007/s12602-020-09638-7

12. Saccà ML, Lodesani M. Isolation of bacterial microbiota associated to honey bees and evaluation of potential biocontrol agents of *Varroa destructor*. *Benef Microbes*. 2020 Oct;11(7):641-54. doi: 10.3920/BM2019.0164
13. Boukid F, Riudavets J, Del Arco L, Castellari M. Impact of diets including agro-industrial by-products on the fatty acid and sterol profiles of larvae biomass from *Ephestia kuehniella*, *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*. *Insects*. 2021 Jul;12(8):672. doi: 10.3390/insects12080672
14. Andreadis SS, Panteli N, Mastoraki M, Rizou E, Stefanou V, Tzentilasvili S, et al. Towards functional insect feeds: Agri-food by-products enriched with post-distillation residues of medicinal aromatic plants in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) breeding. *Antioxidants*. 2021 Dec;11(1):68. doi: 10.3390/antiox11010068
15. Nascimento RQ, Di Mambro Ribeiro CV, Colauto NB, da Silva L, Lemos PV, de Souza Ferreira E, et al. Utilization of agro-industrial residues in the rearing and nutritional enrichment of *Zophobas atratus* larvae: New food raw materials. *Molecules*. 2022 Oct;27(20):6963. doi: 10.3390/molecules27206963
16. Balli D, Cecchi L, Innocenti M, Bellumori M, Mulinacci N. Food by-products valorisation: Grape pomace and olive pomace (pâté) as sources of phenolic compounds and fiber for enrichment of tagliatelle pasta. *Food Chem*. 2021 Sep;355:129642. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129642
17. Cavalcante da Silva SMP, de Carvalho CAL, Sodre GDS, Estevinho LM. Production and characterization of mead from the honey of *Melipona Scutellaris* Stingless Bees. *J Inst Brew*. 2018 Mar;124(2):194-200. doi: 10.1002/jib.485
18. Sen S, Mansell TJ. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol*. 2020 Apr;137:103333. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103333
19. Starowicz M, Granvogl M. Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. *Trends Food Sci Technol*. 2020 Dec;106:402-16. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.006
20. Mohammadi K, Saris PEJ. Biofilm formation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on glass surface during beer bottle ageing. *Beverages*. 2022;8(4):77. doi: 10.3390/beverages8040077
21. Avırvarei AC, Pop CR, Mudura E, Ranga F, Hegheş SC, Gal E, et al. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile and phenolic profiles of rosehip mead. *Antioxidants*. 2023 Jul 19;12(7):1457. doi: 10.3390/antiox12071457
22. Kawa-Rygielska J, Adamenko K, Kucharska AZ, Szatkowska K. Fruit and herbal meads—Chemical composition and antioxidant properties. *Food Chem*. 2019 Jun;283:19-27. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.040
23. Machado MC, Langbehn JT, Oliveira CM, Elyseu F, Cargnin M, Noni Jr AD, et al. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. *Cerâmica*. 2018 Apr;64:207-13. doi: 10.1590/0366-69132018643702324
24. de Oliveira IV, Okaneku BM, dos Santos Rolim CS, Araujo DL, do Nascimento Rolim L, Rodrigues EC, et al. Produção e caracterização do hidromel tipo doce/Production and characterization of sweet type hydromel. *Braz J Dev*. 2020 Mar 10;6(3):11176-91. doi: 10.34117/bjdv6n3-112
25. Ghramh HA, Khan KA. Honey bees prefer pollen substitutes rich in protein content located at short distance from the apiary. *Animals*. 2023 Feb;13(5):885. doi: 10.3390/ani13050885
26. Mortensen AN, Jack CJ, Bustamante TA, Schmehl DR, Ellis JD. Effects of supplemental pollen feeding on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony strength and *Nosema* sp. infection. *J Econ Entomol*. 2019 Feb;112(1):60-6. doi: 10.1093/jee/toy341
27. Shadmehr S, Chamani M, Tajabadi N, Sadeghi AA, Seidavi A. Effect of dietary supplement on the reproductive traits, products and behavioral characteristics of the European honey bee (*Apis mellifera*). *J Apic Res*. 2023 Dec;25:1-9. doi: 10.1080/00218839.2023.2293574
28. Bernard R, Felska M, Małol J. Erythraeid larvae parasitizing dragonflies in Zambia—description of *Leptus (Leptus) chingombensis* sp. nov. with data on biology and ecology of host-parasite interactions. *Syst Appl Acarol* 2019 May;24(5):790-813. doi: 0.11158/saa.24.5.6
29. Little CM, Shutler D, Williams GR. Associations among *Nosema* sp. fungi, *Varroa destructor* mites, and chemical treatments in honey bees, *Apis mellifera*. *J Apic Res*. 2022 May;54(4):378-85. doi: 10.1080/00218839.2016.1159068
30. de Assis JC, da Costa Domingues CE, Tadei R, da Silva CI, Lima HM, Decio P, et al. Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). *Enviro Pollut*. 2022 Jul;304:119140. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119140
31. Wu T, Gao J, Choi YS, Kim DW, Han B, Yang S, et al. Interaction of chlorothalonil and *Varroa destructor* on immature honey bees rearing in vitro. *Sci Total Environ*. 2023 Dec;904:166302. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166302
32. Ryabov EV, Childers AK, Lopez D, Grubbs K, Posada-Florez F, Weaver D, et al. Dynamic evolution in the key honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS Biol*. 2019 Oct;17(10):e3000502. doi: 10.1371/journal.pbio.3000502

33. Martín-Hernández R, Bartolomé C, Chejanovsky N, Le Conte Y, Dalmon A, Dussaubat C, et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environ Microbiol.* 2018 Mar;20(4):1302-29. doi: 10.1111/1462-2920.14103
34. Peña-Chora G, Toledo-Hernández E, Sotelo-Leyva C, Damian-Blanco P, Villanueva-Flores AG, Alvarez-Fitz P, et al. Presence and distribution of pests and diseases of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Mexico: A review. *The Eur Zool J.* 2023 Jul;90(1):224-36. doi: 10.1080/24750263.2023.2182920
35. Winston, ML. A biologia da abelha. Porto Alegre (RS): Magister; 2003.
36. Mattila H, Harris J, Otis G. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Soc.* 2001 Jun;48:88-93. doi: 10.1007/PL00001764
37. Knoll S, Pinna W, Varcasia A, Scala A, Cappai MG. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livest Sci.* 2020 May;235:104011. doi: 10.1016/j.livsci.2020.104011
38. Baur FJ, Enslinger LG. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *J Am Oil Chem Soc.* 1977 Apr;54(4):171-2. doi: 10.1007/BF02670789
39. Lefebvre D, Pierre J. Hive weight as an indicator of bumblebee colony growth. *J Apic Res.* 2006 Jun;45(4):217-8. doi: 10.1080/00218839.2006.11101351
40. Human H, Brodschneider R, Dietemann V, Dively G, Ellis JD, Forsgren E, et al. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *J Apic Res.* 2013 Jan;52(4):1-53. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.10
41. Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, et al. Standard methods for *varroa* research. *J Apic Res.* 2013 Jan 1;52(1):1-54. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.09
42. Jaycox ER, Parise SG. Homesite selection by Italian honey bee swarms, *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Socy.* 1980 Jan;1:171-8.
43. Calderón-Fallas RA, Moreno-Morales E. Nivel de infección del microsporidio *Nosema* sp. en colmenas de abejas africanizadas y su relación con la precipitación y humedad relativa. *Agro Costarric.* 2022 Jun;46(1):65-75. doi: 10.15517/rac.v46i1.49869
44. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. version 4.2-3. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org>
45. Fox J, Weisberg S. An R companion to applied regression. 3. ed. Thousand Oaks (CA): Sage; 2019. Disponível em: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
46. Box GE, Cox DR. An analysis of transformations. *J R Stat Soc B: Statistical Methodology.* 1964 Dec;26(2):211-43. doi: 10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x
47. Yamamura K. Transformation using (x+ 0.5) to stabilize the variance of populations. *Popul Ecol.* 1999 Nov;41(3):229-34. doi: 10.1007/s101440050026
48. Pimentel-Gomes, F. Curso de Estatística experimental. 15. ed. Piracicaba (SP): FAEQ; 2009.
49. Kassambara A. rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests. R package version 0.7.2; 2023. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/rstatix/index.html>
50. Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira da. _ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)_. R package version 1.2.2; 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/index.html>
51. Tellería MC, Salgado-Laurenti CR, Marinozzi LA, Apóstolo N, Pérez B. Protein content of pollen of asteraceae collected by honeybees. *Bee World.* 2019 Oct;96(4):104-7. doi: 10.1080/0005772X.2019.1634958
52. Herbert Jr EW, Shimanuki H, Caron D. Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie.* 1977;8(2):141-6.
53. Herbert Jr EW, Shimanuki H. Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *J Apic Res.* 2015 Mar;17(3):118-22. doi: 10.1080/00218839.1978.11099916
54. Zhang G, Zhang W, Cui X, Xu B. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomol Exp et Appl.* 2015 Jul;156(3):201-10. doi: 10.1111/eea.12342
55. Nation JL, Robinson FA. Concentration of some major and trace elements in honeybees, royal jelly and pollens, determined by atomic absorption spectrophotometry. *J Apic Res.* 2015 Mar;10(1):35-43. doi: 10.1080/00218839.1971.11099668
56. de Sousa RT, Darnerll R, Wright GA. Behavioural regulation of mineral salt intake in honeybees: a self-selection approach. *Phil Trans R Soc B.* 2022 May;377(1853):20210169. doi: 10.1098/rstb.2021.0169
57. Hoover SE, Ovinge LP, Kearns JD. Consumption of supplemental spring protein feeds by western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: effects on colony growth and pollination potential. *J Econ Entomol.* 2022 Feb;115(2):417-29. doi: 10.1093/jee/toac006
58. Lau PW, Nieh JC. Salt preferences of honey bee water foragers. *J Exp Biol.* 2016 Mar;219(6):790-6. doi: 10.1242/jeb.132019
59. Dow JA. The essential roles of metal ions in insect homeostasis and physiology. *Curr Opin Insect Sci.* 2017 Oct;23:43-50. doi: 10.1016/j.cois.2017.07.001

60. Finkelstein CJ, CaraDonna PJ, Gruver A, Welti EA, Kaspari M, Sanders NJ. Sodium-enriched floral nectar increases pollinator visitation rate and diversity. *Biol Lett.* 2022 Mar;18(3):20220016. doi: 10.1098/rsbl.2022.0016
61. Afik O, Delaplane KS, Shafir S, Moo-Valle H, Quezada-Euán JGG. Nectar minerals as regulators of flower visitation in stingless bees and nectar hoarding wasps. *J Chem Ecol.* 2014 Jun;40:476-83. doi:10.1007/s10886-014-0455-8
62. Kumar M, Abrol DP, Sharma D, Vikram US, Singh AK. Impact of artificial diets on performance of *Apis mellifera* colonies during dearth periods. *J Entomol Zool Stud.* 2021 Mar;9(3):404-9.
63. Al-Khalaf S, Sabbar H, Al-H R, Naje AS. The effect of bentonite utilization as a chemical coagulant on the performance of a water treatment plant. *Ecoll Eng Environ Tech (EEET).* 2023;24(3):249-57. doi: 10.12912/27197050/159730
64. Simão L, Wanderley BRDSM, Tavares Vieira MP, da Silva Haas IC, Amboni RDDMC, Fritzen-Freire CB. How do different ingredients and additives affect the production steps and the bioactive potential of mead?. *Food Technol Biotechnol.* 2023 Jun;61(2):179-90. doi: 10.17113/ftb.61.02.23.7622
65. Ahmed J, Thomas L, Arfat YA. Functional, rheological, microstructural and antioxidant properties of quinoa flour in dispersions as influenced by particle size. *Food Res Int.* 2019 Feb;116:302-11. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.039
66. Mourjane A, Hanine H, El Adnany EM, Ouhammou M, Bitar K, Mahrouz M, et al. Determination of the relationship between the granulometry and release of polyphenols using LC-UV, and their antioxidant activity of the pulp powder of the moroccan argan tree, "*Argania spinosa* L.". *Separations.* 2023 Oct;10(10):542. doi: 10.3390/separations10100542
67. Castagnino GL, Arboitte MZ, Lengler S, Garcia GG, Menezes LFGD. Desenvolvimento de núcleos de *Apis mellifera* alimentados com suplemento aminoácido vitamínico, Promotor L. *Ciênc Rural.* 2006 Mar;36(2):685-8. doi: 10.1590/S0103-84782006000200054
68. Castagnino GLB, Cutuli De Simón MT, Meana A, Pinto LFB. Development of colonies of uruçú stingless beesfed a vitamin-amino acid supplement. *Rev Bras Saúde Prod Anim.* 2022 Jul;23:01-12. doi: 10.1590/S1519-9940202200032022
69. Puškadija Z, Spiljak L, Kovačić M. Late winter feeding stimulates rapid spring development of carniolan honey bee colonies (*Apis mellifera carnica*). *Poljoprivreda.* 2017 Jan;23(2):73-7. doi: 10.18047/poljo.23.2.11
70. Martin SJ, Correia-Oliveira ME. The occurrence of ecto-parasitic *Leptus* sp. mites on Africanized honey bees. *J Apic Res.* 2016 Set;55(3):243-6. doi: 10.1080/00218839.2016.1228214
71. Riessberger U, Crailsheim K. Short-ter short-term effect of different weather conditions upon the behaviour of forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie.* 1997 Oct;28(6):411-26. doi: 10.1051/apido:19970608
72. Gregorc A, Sampson B. Diagnosis of *Varroa* mite (*Varroa destructor*) and sustainable control in honey bee (*Apis mellifera*) colonies—A review. *Diversity.* 2019 Dec;11(12):243. doi: 10.3390/d11120243
73. Castilhos D, Polesso AM, da Silva ACF, dos Santos AB, Lopes ATC, Oliveira Filho AA, et al. *Varroa destructor* infestation levels in Africanized honey bee colonies in Brazil from 1977 when first detected to 2020. *Apidologie.* 2023 Jan;54(1):5. doi: 10.1007/s13592-022-00984-9
74. Gage SL, Kramer C, Calle S, Carroll M, Heien M, DeGrandi-Hoffman G. *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). *J Exp Bio.* 2018 Fev;221(4):jeb161489. doi: 10.1242/jeb.161489
75. Macinnis CI, Keddie BA, Pernal SF. Honey bees with a drinking problem: potential routes of *Nosema ceranae* spore transmission. *Parasitology.* 2022 Nov;149(5):573-80. doi: 0.1017/S0031182021001827
76. Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, et al. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res.* 2011 Sep;109:605-12. doi: 1007/s00436-011-2292-9
77. Higes M, Nozal MJ, Alvaro A, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, et al. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie.* 2011 Apr;42:364-77. doi: 10.1007/s13592-011-0003-2
78. García-Vicente EJ, Martín M, Rey-Casero I, Pérez A, Martínez R, Bravo M, et al. Effect of feed supplementation with probiotics and postbiotics on strength and health status of honey bee (*Apis mellifera*) hives during late spring. *Res Vet Sc.* 2023 Jun;59:237-43. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.05.001