

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

COMUNICAÇÃO QUÍMICA MEDIADA POR VOLÁTEIS ENVOLVIDOS NA
ATRATIVIDADE E REPELÊNCIA DE ABELHAS AFRICANIZADAS, *Apis*
mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

Patricia Daniela da Silva Pires
Engenheira Agrônoma /UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Entomologia

Porto Alegre (RS), Brasil.
Abril de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva Pires, Patricia Daniela

COMUNICAÇÃO QUÍMICA MEDIADA POR VOLÁTEIS ENVOLVIDOS NA
ATRATIVIDADE E REPELÊNCIA DE ABELHAS AFRICANIZADAS,
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA:
APIDAE) / Patricia Daniela da Silva Pires. -- 2015.
72 f.

Orientador: Josué Sant'Ana .

Coorientador: Ricardo Bisotto de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. abelha africanizada . 2. comunicação química .
3. atrativos de abelhas .

I. Sant'Ana , Josué , orient. II.

Bisotto de Oliveira, Ricardo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PATRÍCIA DANIELA DA SILVA PIRES
Engenheira Agrônoma - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de
MESTRE EM FITOTECNIA
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 15.04.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.06.2015
Por

JOSUÉ SANT'ANA
Orientador - PPG Fitotecnia
de

Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa

Pós-Graduação em

RICARDO BISOTTO DE OLIVEIRA
Coorientador - SOS Abelhas Brasil

BETINA BLOCHTEIN
PPG Zoologia/PUCRS

PATRÍCIA NUNES SILVA
PPG Zoologia/PUCRS

LUIS FERNANDO WOLFF
EMBRAPA Clima Temperado
Pelotas/RS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

“As pessoas precisam dos insetos para sobreviver, mas os insetos não precisam de nós. Se toda a humanidade desaparecesse amanhã, não teríamos, é provável, a extinção de uma única espécie de insetos (...). No entanto, se os insetos desaparecessem, o ambiente terrestre logo iria entrar em colapso e mergulhar no caos”.

(Edward O. Wilson)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Leni por ter lutado para que eu realizasse os meus projetos, e ao meu pai Heron, por ter sempre me incentivado a estudar, e por sempre estarem em minha vida.

Ao meu tio Eleú por sempre estar presente quando eu precisei.

A minha irmã Paula por ser minha melhor amiga e estar sempre disposta a me ouvir e Paloma, minha gata, que ficou sempre comigo durante a elaboração da dissertação.

Ao Alisson Grillo por estar ao meu lado nessa fase e me ceder o seu ombro sempre e me encorajando a seguir em frente, e por toda ajuda durante os experimentos.

Ao meu orientador, Dr. Josué Sant'Ana e ao meu coorientador Ricardo Bisotto de Oliveira, pelo ensino, orientação e pelo tempo que dedicaram para a minha formação e pela redação da dissertação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia pelo ensino gratuito e de qualidade.

A Tecnano pelo auxílio no projeto, com o fornecimento das emulsões para a realização dos experimentos.

As professoras Luiza Rodrigues Redaelli e Simone Mundstock pela ajuda em minha vida de pesquisadora.

Aos amigos que eu fiz nessa longa caminhada de agrônoma e entomologista: Cláudia Ourique, Daniele Gutterres, Deisi Altafini, Gabriela Chesim, Jessica Oliveira, Leonardo Giraldo, Paola Ramos, Rafael Meirelles e a “chata preferida” Roberta Tognon.

A todos os colegas de laboratório pelas conversas, risadas e pela convivência.

Aos demais amigos e colegas, que sempre fizeram meu coração sorrir, muito obrigada.

COMUNICAÇÃO QUÍMICA MEDIADA POR VOLÁTEIS ENVOLVIDOS NA ATRATIVIDADE E REPELÊNCIA DE ABELHAS AFRICANIZADAS, *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) ¹

Autora: Patricia Daniela da Silva Pires

Orientador: Dr. Josué Sant'Ana

Coorientador: Dr. Ricardo Bisotto de Oliveira

RESUMO

Os semioquímicos podem ser uma ferramenta importante para o manejo de abelhas em áreas urbanas e rurais, seja pelo uso de potenciais voláteis repelentes ou atraentes. O trabalho objetivou avaliar as respostas eletroantegráficas e comportamentais de abelhas africanizadas (operárias), *Apis mellifera*, de diferentes idades, ao feromônio comercial de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure, Contech Inc.), ao óleo essencial de capim limão (OCL), ao benzaldeído (BZA) e ao antranilato de metila (AME); verificar o percentual de ocupação de enxames em caixas iscadas com os mesmos compostos e avaliar o potencial de repelência do BZA e do AME em condições de campo. Em laboratório, foram realizados testes para avaliar as respostas eletroantegráficas (mV) e o comportamento quimiotáxico, em olfatômetro de dupla ou quatro escolhas, de abelhas operárias jovens e/ou velhas (1-5 e 20-30 dias, respectivamente). Os testes de repelência foram executados com o uso de benzaldeído ou antranilato de metila puros. Registrou-se o número médio de abelhas que visitaram os tratamentos com ou sem a presença destas substâncias. Para verificar o percentual de ocupação, foram utilizadas caixas de papelão contendo caixilhos com uma tira de cera de abelha alveolada, iscadas com FNS, OCL, BZA ou AME. Foram utilizados doze caixas por tratamento em Eldorado do Sul e Minas do Leão (RS). Semanalmente as caixas foram vistoriadas e, as ocupadas, substituídas. O limiar de resposta eletroantegráfica foi de 0,1 µg/µL para FNS e de 10 µg/µL para o OCL, o BZA e o AME. O FNS e o OCL desencadearam quimiotaxia positiva em abelhas, já o BZA e AME, comportamento de repelência em olfatometria. Não foi observada diferença tanto na percepção eletrofisiológica quanto na quimiotaxia entre operárias jovens e velhas submetidas aos diferentes odores. Os tratamentos com BZA e AME foram menos visitados pelas abelhas campeiras em relação às soluções de mel sem a presença destas. Observou-se que o feromônio comercial foi o mais atrativo e que o número de enxames capturados nas caixas iscadas com OCL, BZA e AME não diferiu em relação ao controle.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (60p.) Abril, 2015.

CHEMICAL COMMUNICATION OF AFRICANIZED HONEY BEES, *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE), MEDIATED BY ATTRACTANT AND REPELENT VOLATILES ¹

Author: Patricia Daniela da Silva Pires

Adviser: Dr. Josué Sant'Ana

Co-advvisor: Dr. Ricardo Bisotto de Oliveira

ABSTRACT

Semiochemicals might be an important tool for bees management in urban and rural areas, either by its use as potential repellent or attractive volatiles. The study aimed to evaluate the electrophysiological and behavioral responses of africanized honey bees (workers), *Apis mellifera*, at different ages, to commercial synthetic Nasanov pheromone (SNP) (Swarm Catch Lure), to lemongrass essential oil (LGO), to benzaldehyde (BZA) and to methyl anthranilate (MAT); to verify occupancy percentage of swarms in baited cardboard boxes with the same compounds and to evaluate the potential repellency of BZA and MAT under field conditions. Laboratory tests were conducted to observe electroantennographic responses (mV) and chemotactic behavior of young and old workers bees (1-5 and 20-30 days, respectively) in two or four choice olfactometer. The repellency tests were performed, by using pure BZA or MAT. The field bioassay was conducted by using twelve cardboard boxes with a bee wax sheet foundation placed in each frame, baited with NSP, OLG, BZA or MA, in Eldorado do Sul and Minas do Leão (RS). The cardboard boxes were checked weekly and replaced as far as it was occupied by honey bees. The mean number of swarms found in treatments with or without such compounds, was registered. The threshold to Nasanov synthetic pheromone was 0.1 µg/µL and to lemongrass essential oil, benzaldehyde and methyl anthranilate, 10 µg/µL. Nasanov synthetic pheromone and OLG triggered positive chemotaxis in bees, however, BZA and MA, repellency behavior in olfactometry. It was not observed electrophysiological and behavioral difference responses between young and old workers subjected to different odors. Treatments with benzaldehyde and methyl anthranilate were less visited by foraging honey bees than those without compounds (control). Cardboard boxes with commercial pheromone were more attractive to swarms and no differences were found in those baited with LGO, BZA and MAT, as well as, in the control treatment.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (60p.) April, 2015.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Importância das abelhas.....	3
2.2 <i>Apis mellifera</i>	4
2.2.1 Histórico.....	4
2.2.2 Aspectos morfológicos e bioecológicos.....	4
2.2.3 Comunicação química de <i>Apis</i> spp.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Bioensaios eletroantegráficos (EAG).....	15
3.1.1 Testes de sensibilidade e seletividade.....	17
3.2 Bioensaios comportamentais.....	19
3.2.1 Olfatometria.....	19
3.3 Bioensaios de campo.....	22
3.3.1 Efeito do antranilato de metila e do benzaldeído no forrageamento de <i>Apis mellifera</i>	22
3.3.2 Influência da presença de compostos sintéticos no alojamento de enxames de <i>Apis mellifera</i> em caixas isca.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Respostas eletroantegráficas.....	27
4.1.1 Testes de sensibilidade e seletividade	27
4.2 Bioensaios comportamentais.....	35
4.2.1 Olfatometria.....	35
4.3 Bioensaios de campo.....	45
4.3.1 Efeito do antranilato de metila e do benzaldeído no forrageamento de <i>Apis mellifera</i>	45
4.3.2 Influência da presença de compostos sintéticos no alojamento de enxames de <i>Apis mellifera</i> em caixas isca.....	47

	Página
5 CONCLUSÕES.....	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Respostas eletroantenográficas (mV) de abelhas em dois grupos de idade (1-5 e 20-30 dias) aos tratamentos, em papel filtro, com óleo essencial de capim limão (OCL), feromônio de Nasanov sintético (FNS), benzaldeído (BZA), antranilato de metila (AME) e etanol (controle) (n = 15).....	30
2. Respostas eletroantenográficas (mV) (\pm EP) de <i>Apis mellifera</i> campeiras, aos compostos sintéticos: antranilato de metila (AME), benzaldeído (BZA), óleo essencial de capim limão (OLC), formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure) e a emulsão de parafina (controle), expostos por até oito semanas em condições de campo (20 ± 5 °C, $70 \pm 10\%$ UR) (n = 18).....	34
3. Número médio (\pm EP) de enxames de <i>Apis mellifera</i> , coletados em caixas isca, com os compostos sintéticos: antranilato de metila (AME), benzaldeído (BZA), óleo essencial de capim limão (OLC), formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure) e o controle, nas áreas experimentais de Eldorado do Sul (RS) e Minas do Leão (RS), no período de outubro de 2013 a maio de 2014.....	47

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Eletroantenógrafo: (A) eletrodo, em detalhe; (B) pré-amplificador de sinal elétrico; (C) controlador de aquisição de dados; (D) controlador de fluxo de ar e (E) registro da resposta eletroantografica da antena estimulada.....	16
2. Olfatômetro de quatro escolhas. A) bomba de ar; B) fluxímetro; C) borbulhador; D) entradas de ar; E) arena; F) braços da arena e G) área de resposta.....	21
3. Dispositivo de teste. A) alimentador contendo solução de mel e placa de Petri com papel filtro fixados em estaca; b) abelhas marcadas no tratamento controle	23
4. Mapa do Rio Grande do Sul (A) e vista aérea das áreas experimentais: Minas do Leão (B) e Eldorado do Sul (C), RS. Círculos vermelhos delimitam as três áreas na propriedade Pôr-do-Sol (B) e a área parcial na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS (C) (Google Earth, 2013).....	24
5. Caixa isca com enxame de <i>Apis mellifera</i> na área experimental no município de Minas do Leão – RS.....	25
6. Respostas eletroantegráficas (\pm EP) de <i>Apis mellifera</i> campeiras às seis concentrações do feromônio de Nasanov sintético: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).....	28
7. Respostas eletroantegráficas (\pm EP) de <i>Apis mellifera</i> campeiras às seis concentrações do óleo de capim limão: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).....	28
8. Respostas eletroantegráficas (\pm EP) de <i>Apis mellifera</i> campeiras às seis concentrações de benzaldeído, 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).....	29

9. Respostas eletroantenográficas (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações de antranilato de metila: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) 29
10. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade testadas em olfatômetro de dupla escolha submetidas ao feromônio de Nasonov sintético (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e etanol (controle), em papel filtro. *O número de abelhas que se direcionaram ao feromônio de Nasonov difere significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$) NR= Não Responsivas..... 35
11. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade, testadas em olfatômetro de dupla escolha submetidas óleo de capim limão (OCL) (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e etanol (controle) em papel filtro. *O número de abelhas que se direcionaram ao OCL difere significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$) NR= Não Responsivas..... 38
12. Tempo de residência (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* com idade entre 1-5 e 20-30 dias de idade, nos braços do olfatômetro de quatro escolhas contendo antranilato de metila (A1, A2 e A3) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou etanol. *Colunas de mesma cor seguidas de letras maiúsculas, e de cores diferentes, dentro de cada tratamento, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si, pelo teste de Friedman ($\alpha = 0,05$). Tempo de observação: 5 min..... 40
13. Tempo de residência (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* com idade entre 1-5 e 20-30 dias de idade, nos braços do olfatômetro de quatro escolhas contendo benzaldeído (B1, B2, B3) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou etanol. *Colunas de mesma cor seguidas de letras maiúsculas, e de cores diferentes, dentro de cada tratamento, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si, pelo teste de Friedman ($\alpha = 0,05$). Tempo de observação: 5 min..... 42

14. Respostas quimiotáticas (%) de operárias de *Apis mellifera* com idade de 20-30 dias, testadas em olfatômetro de dupla escolha, submetidas à formulação comercial do feromônio de Nasonov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure) e controle (tubo Eppendorf vazio) expostos ao ambiente por até oito semanas. Todas as respostas ao FNS diferiram significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$)..... 44
15. Respostas quimiotáticas (%) de operárias de *Apis mellifera* com idade de 20-30 dias, testadas em olfatômetro de dupla escolha, submetidas ao óleo de capim limão (OCL) (10%), em emulsão de parafina, e ao tratamento controle (emulsão inerte). *Respostas ao OCL seguidas de asteriscos diferem significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$). ns = não significativo..... 45

1 INTRODUÇÃO

A eusocialidade em *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae) é mediada pela presença de várias substâncias produzidas por suas glândulas exócrinas. Estes compostos (feromônios) são empregados por operárias, zangões e rainhas no reconhecimento de seus companheiros de colônia, acasalamento, defesa do ninho e marcadores de percurso. Em operárias, os feromônios são responsáveis pela marcação de fontes de alimentos e água, além de atuarem nos comportamentos de alarme e defesa, entre outros. Um dos mais importantes semioquímicos produzidos por esta casta é secretado pelas glândulas de Nasanov. Esse feromônio é responsável pela orientação, aglomeração e forrageamento, auxiliando as abelhas a encontrarem sítios de alimentação e de nidificação.

Abelhas africanizadas são conhecidas por suas características defensivas e seu maior potencial enxameatório em relação às raças europeias. Esse processo natural está relacionado ao comportamento reprodutivo das abelhas e permite a dispersão dos enxames no ambiente. Durante este processo, algumas abelhas da colônia matriz que está prestes a enxamear, ou do enxame que está em processo de transição, visitam locais em busca de um

novo sítio para alojamento, marcando-o com o feromônio de Nasonov. Em ambientes naturais os enxames normalmente se alojam em buracos no solo, árvores ocas, entre outras cavidades. Porém, em áreas urbanas estes podem utilizar edificações e outras estruturas. Devido seu comportamento defensivo, as abelhas ao se sentirem ameaçadas atacam a vítima e liberam feromônios que recrutam outras operárias da colmeia e podem ocasionar acidentes para pessoas e animais domésticos.

Os semioquímicos podem ser uma ferramenta importante para o manejo de abelhas em áreas urbanas e rurais, seja pelo uso de potenciais voláteis repelentes em locais onde estes insetos são indesejados, quanto de atraentes, incrementando, por exemplo, a captura de enxames em caixas isca as quais podem ser removidas, posteriormente, para apiários. Estes fatos motivaram a realização de experimentos, com o feromônio de Nasonov sintético e o óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*), atrativos para abelhas, bem como, com o antranilato de metila e benzaldeído, potenciais repelentes para insetos.

Desta forma, o trabalho teve os seguintes objetivos: avaliar as respostas eletroantegráficas e comportamentais (olfatometria) de abelhas africanizadas *Apis mellifera* (operárias) ao feromônio de Nasonov sintético, ao óleo essencial de capim limão, ao benzaldeído e ao antranilato de metila; avaliar o potencial de repelência do benzaldeído e do antranilato de metila em condições de campo e verificar o percentual de ocupação de caixas iscadas com os mesmos compostos por enxames de abelhas africanizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância das abelhas

As abelhas são responsáveis por cerca de 80% da polinização dos cultivos agrícolas. Uma polinização adequada contribui para a melhoria na qualidade dos frutos, promove um amadurecimento mais uniforme e aumenta o número de sementes ou grãos. Além deste papel, estes insetos também estão envolvidos na produção de mel, própolis, cera e geleia real (Kevan & Imperatriz-Fonseca, 2002; Ricket *et al.*, 2008).

O Rio Grande do Sul responde por 20% da produção nacional de mel, sendo o maior produtor do Brasil (IBGE, 2012). Em 2013 foram exportados 16 mil toneladas (SEBRAE, 2014). Outro produto de grande valor é o própolis, apreciado pelo mercado europeu e asiático, o produto *in natura* brasileiro é responsável por cerca de 90% do abastecimento no Japão, sendo que Minas Gerais detém 70% da produção nacional, fornecendo especialmente o própolis verde de *Bacharis dracunculifolia* (Asteraceae) (IBGE, 2012).

2.2 *Apis mellifera*

2.2.1 Histórico

Apis mellifera é originária da África tropical, tendo se dispersado, posteriormente, para os continentes asiático e europeu (Weinstock *et al.*,

2006). Na América do Sul, foi introduzida pelos colonizadores no período colonial, sendo as abelhas alemãs (*A. mellifera mellifera*) as primeiras a serem trazidas para o Brasil em meados de 1840, seguido das italianas (*A. mellifera ligustica*), entre os anos de 1870 e 1880 (Gonçalves, 1994; Delavira & Agostinho, 1999).

Em 1956, através de um programa de melhoramento genético para aumentar a produtividade das colmeias e alavancar a produção de mel no Brasil, foram importadas rainhas de abelhas africanas, *Apis mellifera scutellata* Lepeletier 1836. A enxameação das abelhas africanas das colmeias do apiário experimental deu início a um processo de cruzamentos naturais com as europeias já existentes no país, originando híbridos que passaram a ser chamados de abelhas africanizadas (Kerr, 1967). Devido ao comportamento defensivo dos híbridos e a inúmeros acidentes envolvendo-os, houve uma redução drástica da atividade apícola ocasionando uma queda na produção de mel durante aquele período. A partir da década de 70 iniciou-se uma nova fase na apicultura brasileira com a utilização de equipamentos e técnicas adequados ao manejo de abelhas africanizadas (Pereira *et al.*, 2003).

2.2.2 Aspectos morfológicos e bioecológicos

O comportamento de *A. mellifera* é categorizado como eusocial, visto que nessa espécie existe a colaboração dos indivíduos da mesma colônia no cuidado parental, há sobreposição de gerações e a presença de castas distintas, ou seja, reprodutiva (rainhas e zangões) e de operárias (Rothenbuhler *et al.*, 1968). A rainha é considerada o personagem central da colmeia, pois é dela que depende a harmonia e a reprodução da colônia, sendo a única capaz

de colocar ovos fecundados. As abelhas operárias são responsáveis pela maioria das tarefas da colmeia, como limpeza dos alvéolos, cuidados com a cria e construção de favos, além de atividades externas como guarda e forrageamento. Já os zangões, podem ser encontrados nas colmeias em épocas reprodutivas e tem como função o acasalamento (Winston, 2003).

A rainha pode ovipositar em dois tipos de células de tamanhos distintos. Favos com células menores (5,1 mm de diâmetro) são mais frequentes na colmeia e recebem ovos fecundados que normalmente originam abelhas operárias. Nas células maiores (6,5 mm de diâmetro), poderão ser depositados óvulos (haploides), onde se desenvolverão os machos (zangões) (Winston, 1987). Para a formação de uma nova princesa as operárias roem os alvéolos adjacentes em torno de larvas diplóides com até 3 dias de idade, constroem células diferenciadas chamadas de “realeiras” e fornecem geleia real até o final desse estágio. Dessa forma, o tamanho dos alvéolos e a qualidade do alimento são fatores que influenciam na determinação da casta das fêmeas (Pereira *et al.*, 2003).

As operárias, ao contrário da rainha, apresentam ovários não funcionais em virtude da alimentação recebida no estágio larval e pela influencia de determinados feromônios liberados pela rainha (Loper *et al.*, 1993; Pham-Delègue *et al.*, 1993). Em situações adversas, seja pela ausência da rainha ou pela incapacidade desta produzir feromônios inibitórios, as abelhas operárias podem ovipositar óvulos originando zangões por partenogênese arrenótoca, porém, esses machos não são reprodutivamente viáveis (Cruz-Landim, 2004).

O desenvolvimento ovo-adulto das abelhas pode variar de acordo com a subespécie ou raça. Em abelhas europeias, como *A. mellifera ligustica* e *A.*

mellifera carnica, o tempo de desenvolvimento é, em média, de 16 dias para rainhas, de 21 para operárias e de 24 dias para zangões (Winston, 1992). Para abelhas africanizadas, esse período é cerca de um dia mais curto para todas as castas (Nunes-Silva *et al.*, 2006). A abelha rainha pode viver até cinco anos, um zangão até quatro meses antes do período reprodutivo e as operárias têm uma longevidade média de 42 dias (Winston, 2003).

A dieta natural das abelhas consiste exclusivamente de pólen e néctar coletado das flores, podendo ocasionalmente ser suplementada por água e resinas (Michener, 1974). Há uma regulação do tamanho da população de abelhas campeiras e a quantidade de pólen disponível (Pankiw & Page Jr., 2001). Colmeias com baixa disponibilidade de pólen ou com um aumento do número de cria, demandam uma maior procura por flores, ocasionando um aumento da população forrageira (Eckert *et al.*, 1994; Pankiw & Page Jr., 2001). Níveis de armazenamento de pólen podem ter um efeito direto sobre a aptidão da colmeia em sobreviver em épocas com menor disponibilidade de recursos, podendo ser este um fator importante no processo enxameatório (Fewell & Winston, 1992).

Em *A. mellifera* existem dois tipos de saída em massa dos indivíduos da colônia: enxameação migratória e reprodutiva. Esta última resulta na saída de uma parte da população de operárias e a rainha velha, sendo considerado um processo natural nesta espécie. Alguns dias antes deste evento ocorrer, abelhas campeiras, também denominadas de “batedoras”, saem em busca de um novo local para nidificação. Essas, ao localizar um novo habitat, marcam-no com o feromônio de Nasonov e guiam o enxame para a fundação de uma nova colônia (Beekman *et al.*, 2006; Hepburn, 2011). A formação da nova rainha

inicia um mês antes da enxameação (Winston, 1987) e todo o processo é guiado pelas abelhas operárias (Chung- Cheng *et al.*, 2003). O número de enxames formados a partir de uma colônia matriz varia de acordo com as condições ambientais e os recursos (Winston, 1987).

Fatores como contração de doenças, stress, pólen contaminado ou tóxico, temperaturas baixas ou muito altas, baixa umidade relativa, falta de alimento ou mesmo aumento do tamanho populacional podem desencadear o processo de enxameação migratória (Hepburn, 2011). Os enxames migratórios são normalmente sazonais, com movimentos de colônias principalmente em regiões tropicais, em geral sem a produção de novas rainhas e zangões. Este tipo de comportamento é considerado estratégico para a sobrevivência das colônias, pois possibilita um maior acesso a recursos alimentares relacionados a condições ambientais adequadas (Hepburn, 2011).

Em *A. mellifera* o alimento é transferido diretamente de uma operária para outra, bem como para a rainha e zangões. A trofalaxia é importante para fortalecer as relações sociais entre os membros da colmeia. Durante a transferência, as glossas e as antenas do doador e do receptor estão em constante movimento, fazendo com que ambos mantenham contato (Free, 1980).

As antenas dos insetos são órgãos dotados de sensilas inervadas por neuroreceptores especializados na detecção de diferentes modalidades sensoriais (Hildebrand & Shepherd, 1997). A antena de uma operária de *A. mellifera* possui cerca de 6.000 sensilas olfativas (Esslen & Kaissling, 1976) e uma lateralização anatômica, sendo a antena direita mais perceptiva aos odores (Anfora *et al.*, 2010). Já as de um zangão, são compostas por 18.600

sensilas, porém essas são especializadas na detecção do feromônio sexual da princesa (Esslen & Kaissling, 1976). Os principais tipos de sensilas encontradas nas antenas são tricóides, basicônicas, celocônicas e placóides (Carvalho *et al.*, 2001; Frasnelli *et al.*, 2010).

A comunicação entre as abelhas é realizada por meio de sinais físicos (danças e sons) e químicos (feromônios) (Wilson, 1965; Boucher & Schneider, 2009). A “dança” é utilizada para indicar a direção de um recurso e a vibração das asas e do abdome, na superfície do favo, pode informar sobre a qualidade do mesmo. Apesar da importância da dança, segundo Gonçalves (1969), a marcação através de pistas odoríferas tem maior influência no forrageamento, pois apenas 33% das informações direcionais são transmitidas por meio da dança e 67%, pelo odor na fonte de alimento.

2.2.3 Comunicação química de *Apis* spp.

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os indivíduos são denominadas semioquímicos, essas quando são liberadas por um organismo no ambiente, provocam uma mudança fisiológica e/ou comportamental em outro indivíduo (Vilela & Della Lúcia, 2001).

Os feromônios são uma das principais ferramentas utilizadas pelos indivíduos dentro de uma colmeia (Winston & Slessor, 1992). O emissor deste sinal químico normalmente é a rainha, podendo também as operárias atuar nesta comunicação. Os voláteis liberados pela rainha são responsáveis por efeitos inibitórios na produção de novas princesas, controle do desenvolvimento ovariano das operárias, atração de zangões, entre outros (Loper *et al.*, 1993; Pham-Delègue *et al.*, 1993). Nas operárias, os feromônios

produzidos atuam na marcação da colônia e de fontes de alimentos e água, além de terem um importante papel no comportamento de alarme e defesa (Carvalho *et al.*, 2001).

As glândulas exócrinas responsáveis pela produção de feromônios podem ser encontradas em diferentes partes do corpo das abelhas e desencadeiam diferentes tipos de comportamento. Além disso, os componentes que constituem o feromônio em uma determinada glândula podem variar de acordo com a idade e a atividade da abelha dentro da colônia (Carvalho *et al.*, 2001).

Um dos principais feromônios sintetizados pela rainha é o mandibular (ácido 9-oxo-*trans*-2-decenóico), o qual é produzido na glândula de mesmo nome (Free, 1980 apud Carvalho *et al.*, 2001). Ainda há mais três feromônios ácido (+)-9-hidroxidec-2*E*-oico, metil *p*-hidroxibenzoato e 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol, produzidos nessas glândulas que agem em sinergismo com o ácido 9-oxo-*trans*-2-decenóico (Slessor *et al.*, 1990). Pham-Delègue *et al.* (1993) observaram que apesar de todas as operárias serem responsivas ao feromônio mandibular da rainha, o grupo com até cinco dias de idade é mais sensível a este odor, sendo que a presença do feromônio inibe a produção de outras princesas. Segundo Trhlin & Rajchard (2011), quando ocorre a diminuição da concentração do feromônio, como em colmeias com populações grandes, há a diluição dos voláteis o que pode desencadear o processo de produção de novas princesas. Segundo os autores, as secreções produzidas nas glândulas mandibulares também são utilizadas para atrair os machos durante o voo nupcial. Esses autores também referem que existem pelo menos outros oito compostos envolvidos, além do ácido 9-oxo-*trans*-2-decenóico, o

que contribui para que o feromônio sintético não seja perceptível para todas as raças de *A. mellifera*.

Os feromônios produzidos pelas glândulas do tergito abdominal (ácido 9-oxidecenóico) de rainhas também atuam na comunicação com as operárias, desencadeando comportamento semelhante aos compostos produzidos pela glândula de Nasanov (Mota & Cruz-Landim, 1988). Esta se situa na superfície dorsal do sétimo segmento abdominal das operárias, e secreta principalmente citral, geraniol e ácido gerânico, contendo o seu isômero geométrico ácido nerólico. Esse semioquímico é responsável pela sinalização, sendo uma de suas funções, orientar as forrageadoras a visitar determinados locais, como fontes de alimento e sítios de nidificação (Winston, 1987).

A quimiotaxia de *A. mellifera* a 195 substâncias puras ou misturadas foi observada por Woodrow *et al.* (1965), os quais constataram que 142 apresentaram baixo ou nenhum efeito sobre esta espécie, 30 foram consideradas como moderadamente repelentes, 19 fortemente repelentes, dentre estas o ácido acético, ácido butílico, ácido propriônico e apenas quatro foram consideradas moderadamente atrativas, entre elas, o feromônio de rainha (ácido 9-oxo-trans-2-decenóico).

A maioria dos óleos essenciais, isolados de plantas, apresentam propriedades antagonistas aos insetos, ou seja, atuam na repelência ou mortalidade dos mesmos (Curtis *et al.*, 1989). Estes óleos são produtos naturais com baixa toxicidade para mamíferos e com comprovada eficácia no manejo de pragas (Katz *et al.*, 2008). Plantas do gênero *Cymbopogon* são tradicionalmente utilizadas como repelentes de mosquitos (Moore *et al.*, 2007). No entanto, já foi observada a atratividade de *Apis mellifera* ao óleo de capim

limão (*Cymbopogon citratus*) (Lindauer, 1951; Shimidt, 1994; Leopoldino *et al.*, 2002; Malerbo-Souza *et al.*, 2004), provavelmente por esse conter substâncias como o citral e o geraniol, ambas encontradas no feromônio de Nasanov (Free, 1987).

Leopoldino *et al.* (2002) ao testarem o óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) obtiveram 70% de ocupação nas caixas iscadas no município de Pimenteiras, Piauí, sendo que nas caixas controle, o percentual de captura foi inferior a 30%. Quando os autores compararam o óleo essencial ao feromônio de Nasanov sintético, verificaram 90% de ocupação de enxames de abelhas africanizadas nas caixas iscadas com o feromônio. De acordo com Schimdt (1999), caixas de madeira com o feromônio de Nasanov atraíram cinco vezes mais enxames de abelhas europeias do que as controle. Outros odores testados como linalol, óleo de cravo e o feromônio sexual da traça da cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), não foram atrativos quando comparados ao feromônio sintético. Posteriormente o autor constatou que favos contendo mel atraíram mais abelhas do que os que continham própolis, diferenciando também da testemunha. Segundo Schmidt (2001), favos vazios podem dar um indicativo de que o local é favorável para nidificação, uma vez que outra colmeia já se estabeleceu anteriormente.

O efeito de dez tratamentos (Bee-Here[®], extrato de capim limão, 2-heptanona, amoníaco, óleo de amêndoas, pó de urucum, óleo de citronela, essências de mel, de flor de eucalipto e de flor de laranjeira) foi avaliado por Marlebo-Souza & Nogueiro-Couto (1998) em *A. mellifera*. Os autores observaram que a maior atratividade foi maior para o Bee-Here[®], seguido do extrato de capim limão, não havendo visitação de abelhas nas placas que

continham as essências de mel, eucalipto e de flor de laranjeira. Os produtos que apresentaram maior repelência foram o óleo de citronela, seguido de 2-heptanona.

Os compostos N,N-dietiltoluamida, Pyranha® e Repelx® foram testados por Schmidt *et al.* (2003). De acordo com estes, apenas o Repelx® repeliu as abelhas. Os demais contêm odores similares ao citral, geraniol e ácido gerânio, os quais podem ser atrativos para abelhas, apesar de repelir outros insetos.

A maioria dos odores encontrados pelas abelhas em seu ambiente natural são perfumes florais compostos por uma complexa mistura de produtos químicos como terpenos, alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres (Knudsen *et al.*, 2006). Alguns metabólitos de plantas podem agir como um mecanismo de defesa fisiológica, como é o caso do antranilato de metila (Murai *et al.*, 2000). O antranilato é um volátil de planta considerado repelente para insetos e pássaros (Pankiw, 2009; Werner & Provenza, 2011).

Pankiw (2009) ao realizar testes para avaliar o potencial de defesa de colônias de *A. mellifera* constatou que o antranilato de metila (10%), ao ser aplicado nas roupas do apicultor, reduziu o número de ataques em 94%, quando comparado ao tratamento controle. A autora também observou uma redução no número de ninhos construídos pela vespa *Polistes* sp. (Hymenoptera: Vespidae) na presença deste composto. Esse metabólico também desencadeia respostas em outros insetos da família Hymenoptera como é descrito por Murai *et al.* (2000), os autores ao aplicarem essa substância (1%) em armadilhas, próximas a hortas infestadas de *Thrips hawaiiensis* Morgan 1913 (Thysanoptera: Thripidae) e *Thrips coloratus*

Schmutz 1913 (Thysanoptera: Thripidae), verificaram o aumento da quantidade do parasitóide *Ceranisus menes* (Hymenoptera: Eulophidae).

Outro volátil secundário de plantas é o benzaldeído, encontrado em óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* - Lauraceae), óleo de amêndoa amarga (*Amygdalus communis* - Rosaceae), entre outras plantas (Azambuja, 2009). De acordo com Sackin & Fishman (1998) o produto US 5738863 A (sem nome comercial), a base de benzaldeído e óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), repele himenópteros. Collins *et al.* (1996) avaliaram o efeito de três repelentes de mosquitos (benzamida, 2-etilexano-1,3-diol, e ftalato de dimetila) e dois outros compostos (benzaldeído e mentol, ambos à 15%) em abelhas de raças de origem europeia e africanizada. Foram simulados ataques de abelhas sobre panos pretos e contabilizado o número médio de ferrões aderidos antes e após a aplicação dos referidos compostos. Os autores observaram que todos os tratamentos reduziram significativamente o número de abelhas sobre o alvo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos insetos

As abelhas utilizadas nos bioensaios foram provenientes de quatro colônias de *Apis mellifera* africanizadas alojadas em colmeias padrão “Langstroth” mantidas no Campus da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (30°01’S; 51°13’O). Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Etologia e Ecologia Química de Insetos (LEEQI) da UFRGS, em Porto Alegre - RS.

Para a obtenção das operárias foram isolados, de diferentes colmeias, favos com cria madura operculada. Estes eram revestidos com uma tela de *voile* para evitar o escape das abelhas emergentes, levados para o laboratório e mantidos na posição vertical (como estavam na colmeia), na escotofase em câmara climatizada (30 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ UR). Os favos telados eram inspecionados diariamente, entre 8 e 9 horas, e as abelhas emergidas marcadas no tórax, com tinta atóxica (caneta UniPOSCA™), sendo posteriormente, liberadas na colmeia de onde eram provenientes. Aproximadamente 25 abelhas eram marcadas diariamente, com cores diferentes, possibilitando o controle da idade.

Uma hora antes da realização dos bioensaios, as colmeias eram manejadas com fumigador e as operárias transferidas com o auxílio de um aspirador de pó portátil modificado (Makita, mod. CI 100 Dw), para copos plásticos (200 mL) com água destilada, oferecida em buchas de algodão através de um orifício na tampa.

3.2 Bioensaios eletroantenográficos (EAG)

Foram avaliadas as respostas eletroantenográficas de operárias de *A. mellifera* com intervalos de idade entre 1-5 (jovens, nutrízes) e/ou 20-30 dias (velhas, campeiras).

Os insetos eram imobilizados, com o auxílio de uma pinça e levados à observação em estereomicroscópio (aumento de 400 X) onde era feita a secção da antena direita, conforme metodologia de Anfora *et al.* (2010). Estas eram acopladas a um eletrodo de prata de dois filamentos utilizando-se gel condutor (Spectra 360, Electrode Gel-Parker). A extremidade basal e apical da antena ficava aderida ao eletrodo registrador e ao neutro, respectivamente. A resposta analógica do sinal, em milivolts (mV), era capturada, amplificada e processada com um controlador de aquisição de dados (IDAC-4, Syntech[®]) e, posteriormente, registradas através de software (EAG2000, Syntech[®]).

Os tratamentos eram aplicados (10 μ L), individualmente sobre papel filtro (1,5 X 2,5 cm) dobrados em forma de gaita aguardando-se dois minutos para evaporação do solvente, sendo então colocado nas extremidades posteriores de pipetas Pasteur. A extremidade anterior desta era colocada dentro de um orifício na parede de um tubo de metal (1 cm de diâmetro X 18

cm de comprimento), orientado em direção à antena, a uma distância aproximada de 1 cm. Para evitar o ressecamento e, conseqüentemente, aumentar a durabilidade das antenas, estas foram constantemente umedificadas durante os testes com um fluxo de ar que passava por um balão de Erlenmeyer (50 mL) contendo água destilada (borbulhador) (Figura 1).

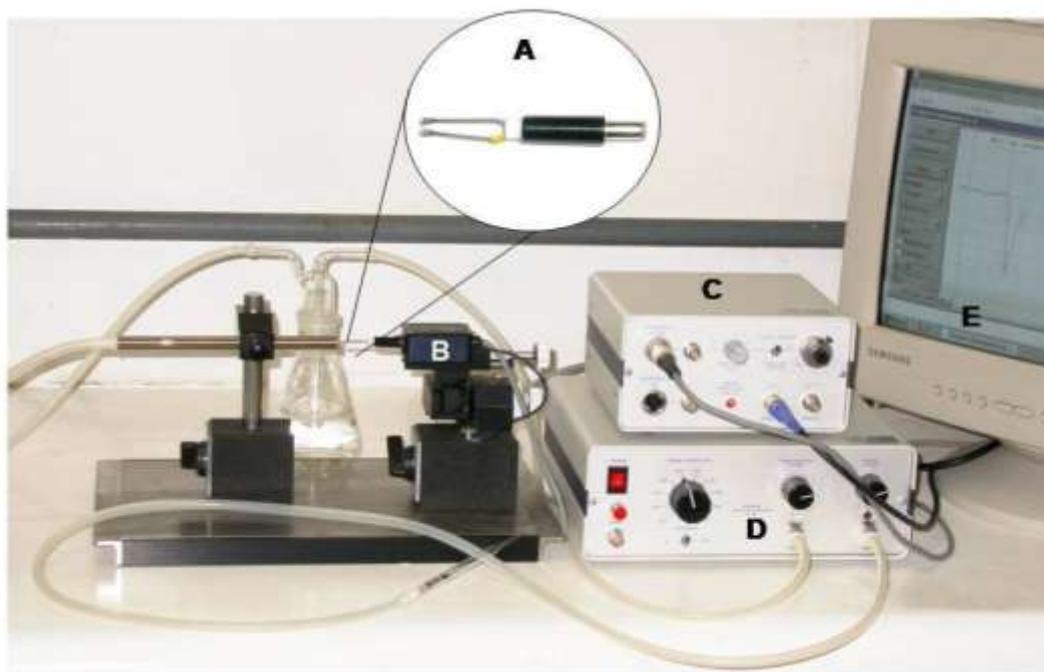


FIGURA 1. Eletroanténografo: (A) eletrodo, em detalhe; (B) pré-amplificador de sinal elétrico; (C) controlador de aquisição de dados; (D) controlador de fluxo de ar e (E) registro da resposta eletroanténográfica da antena estimulada.

As antenas foram submetidas a pulsos de ar, gerados por um controlador de fluxo (CS-02, Syntech®), em um volume de 2,5 mL/0,5 s, com os diferentes tratamentos testados, incluindo o controle, etanol. Foi estipulado um tempo de um minuto entre sucessivos estímulos, para que a antena recuperasse sua capacidade de percepção odorífera. Os papéis contendo as diferentes substâncias foram renovados a cada três antenas testadas, para que a volatilização dos compostos não interferisse nas respostas.

3.1.1 Testes de sensibilidade e seletividade

Foi avaliada a sensibilidade de operárias campeiras de *A. mellifera* ao óleo essencial de capim limão (OCL) [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.] (Tekpon Ltda.), feromônio de Nasanov sintético (FNS) (0,5 mL/Eppendorf®) (Swarm Catch Lure, Contech Inc.), benzaldeído (BZA) (99%; Sigma-Aldrich) e antranilato de metila (AME) (98%; Sigma-Aldrich), em cinco concentrações (0,01, 0,1; 1,0; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), diluídos em etanol PA (Sigma-Aldrich) (controle), bem como, as substâncias puras. Todos os tratamentos foram impregnados em papel filtro (Whatman, 4 x 15 cm/80g/m²).

A seletividade de abelhas jovens e/ou velhas foi registrada utilizando-se os mesmos compostos do experimento descrito anteriormente, porém, em dois diferentes veículos, ou seja, papel filtro (Whatman, 4 x 15 cm/80g/m²) e emulsão de parafina.

Nos testes com papel foi adicionado, separadamente, um volume de 10 μL de cada um dos tratamentos em uma única concentração (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), com o auxílio de uma pipeta automática (Discovery Comfort®). A ordem de exposição dos estímulos às antenas foi aleatória, com exceção do controle (etanol), o qual era utilizado sempre no início e ao final do bioensaio.

A emulsão de parafina foi elaborada e fornecida pela empresa Tecnano - Nanotecnologia para a Agricultura, Porto Alegre-RS. Nesta, foram adicionados, 10% de OCL, de BZA ou de AME. Também foi avaliada a formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (Swarm Catch Lure, Contech Inc.), o qual foi considerado o controle positivo do bioensaio.

As emulsões (1g) com cada uma das três substâncias, bem como, o produto inerte (controle) foram pesadas em balança de precisão e colocadas, com o auxílio de uma seringa, sobre um papel sulfite de 3 cm². Posteriormente foram inseridas no interior de caixas de papelão com volume de 35 L, contendo dois caixilhos com uma tira de cera de 5 cm (três caixas por tratamento) e mantidas em condições de campo. Assim como as emulsões, a isca comercial foi submetida ao mesmo período de exposição em condições de campo (20 ± 5 °C, $70 \pm 10\%$ UR). Foram expostas 24 alíquotas (emulsões) para cada tratamento, assim como 24 tubos contendo FNS. Para a realização dos bioensaios, a cada sete dias eram retirados três amostras de cada tratamento, ao longo de oito semanas de exposição, sendo estas armazenadas em temperatura de - 4 °C até a realização dos testes. Nesse experimento, foram avaliadas apenas antenas de abelhas campeiras.

Os tratamentos com diferentes dias de exposição eram colocados dentro de tubos adaptados tipo Falcon (50 mL) e oferecidos, semanalmente e de forma aleatória. Para todas as antenas testadas, sempre o primeiro e o último estímulo foram com a emulsão inerte (controle).

Foram realizadas, no mínimo, 15 repetições com cada um dos tratamentos. As médias das respostas (mV) foram testadas quanto à normalidade, submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com 95% de confiabilidade utilizando-se o software Bioestat 5.3[®] (Ayres *et al.*, 2007).

3.3 Bioensaios Comportamentais

3.2.1 Olfatometria

Os testes foram conduzidos em câmara climatizada com condições controladas (25 ± 1 °C e 70 ± 10 % UR), entre as 9 e 15 horas, na fotofase (900 lumens). Antes do início dos experimentos os insetos eram aclimatados por 30 minutos na sala teste. Foi realizado, no mínimo, 40 repetições para cada tratamento e cada inseto foi observado por um período de até 5 minutos. Para a análise estatística, somente os insetos responsivos foram considerados.

Foram avaliadas as respostas quimiotáxicas de operárias jovens e/ou velhas de *A. mellifera*, ao OCL, FNS, BZA e AME em dois diferentes veículos (papel filtro e emulsão de parafina) e com a utilização de dois tipos de olfatômetro: de duas escolhas (tipo “Y”) para os testes com substâncias atraentes, óleo de capim limão e feromônio de Nasanov sintético e de quatro escolhas, para repelentes como benzaldeído e antranilato de metila.

Nos bioensaios utilizando o papel filtro (1,5 x 2,5 cm) foram registradas as respostas de abelhas nutrizes e campeiras. Nestes, pipetou-se 10 µL de cada tratamento contendo as substâncias isoladas em diferentes concentrações: 0,1 µg/µL para o FNS, 10 µg/µL para o OCL, AME e BZA, todas diluídas em etanol. As concentrações foram definidas através do teste de sensibilidade em EAG (item 3.1.1), que através do limiar de resposta possibilitou a determinação da concentração mais adequada para cada tratamento. O OCL também foi avaliado na concentração de 0,1 µg/µL.

Nos testes com as emulsões, previamente descritas no item 3.1, foi observada à quimiotaxia somente de campeiras frente aos tratamentos OCL, AME e BZA, bem como à emulsão inerte (controle). Também foram observadas as respostas de *A. mellifera* ao FNS, sendo seu controle um tubo de mesmo tipo vazio.

A arena do olfatômetro de dupla escolha tipo “Y” foi confeccionada com tubos de vidro transparente com 2 cm de diâmetro interno, arena inicial com 10 cm, bifurcada em dois “braços menores” de 8 cm de comprimento, cada. Um fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativado, era conduzido para dentro do sistema com o auxílio de uma bomba a vácuo conectada a um fluxímetro e um borbulhador, a uma taxa de 0,3 L/min, ligado às extremidades distais dos dois braços menores do olfatômetro.

Cada indivíduo era liberado na entrada da arena e utilizado somente uma vez, sendo as respostas consideradas positivas quando as abelhas alcançavam a fonte de odor ou percorriam, pelo menos, 4 cm dentro de um dos “braços menores” permanecendo nessa área por, no mínimo, 30 segundos.

A cada quatro repetições o olfatômetro era invertido horizontalmente (rotação de 180°) e, a cada oito, era lavado com água, sabão neutro, enxaguado e lavado novamente com etanol. Após este procedimento o mesmo era seco em estufa de esterilização a 150 °C e os papéis filtros com os tratamentos, renovados. Tanto o OCL como o FNS foram colocados isoladamente na extremidade de um dos braços menores do olfatômetro e sempre contrastados com o etanol (controle).

O olfatômetro de quatro escolhas era composto por uma arena (1,5 cm de espessura) de material acrílico em formato de “X”, coberta por duas placas de vidro, uma na parte inferior e outra na superior, com 484 cm² (Figura 2). O fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo e umidificado através de um borbulhador contendo água destilada, era conduzido para dentro do sistema com auxílio de um propulsor conectado em um fluxímetro a uma taxa de 0,6

L/min para cada um dos quatro braços do olfatômetro, sendo a taxa de vácuo total do sistema de 0,4 L/min.

Após a aclimação, os insetos foram liberados individualmente no centro da arena e submetidos à escolha entre dois tratamentos, posicionados nas extremidades de cada um dos quatro braços do olfatômetro. Em três das quatro extremidades (braços) foram posicionados o benzaldeído ou o antranilato de metila, em triplicata. Na quarta extremidade, foi colocado o controle (etanol).

A cada quatro repetições o tratamento foi renovado e a cada oito o olfatômetro foi lavado com sabão neutro e água destilada, enxaguado com etanol e seco em estufa de esterilização a 60 °C. Depois deste procedimento, os tratamentos foram rotacionados.

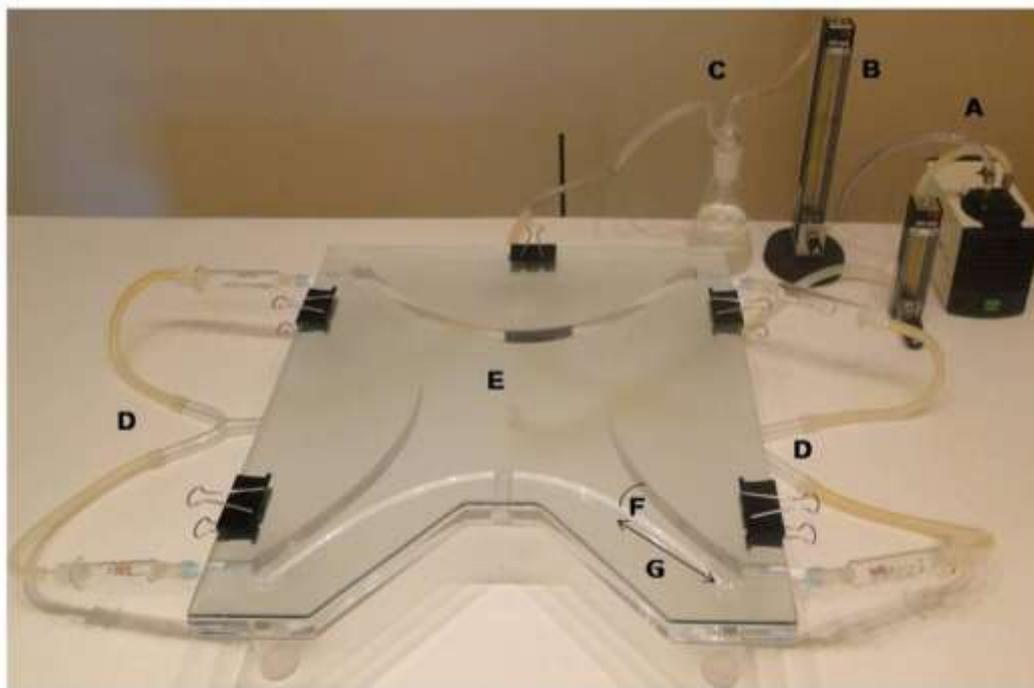


FIGURA 2. Olfatômetro de quatro escolhas. A) bomba de ar; B) fluxímetro; C) borbulhador; D) entradas de ar; E) arena; F) braços da arena e G) área de resposta

Para análise considerou-se o tempo de residência, em segundos, dos insetos em cada braço do olfatômetro. As abelhas que permaneceram somente na área central deste ou ficaram por menos de 60 s nos braços, foram considerados não responsivas e, portanto, desconsideradas na análise estatística.

Nos experimentos comportamentais de dupla escolha, os dados foram comparados pela análise do Qui-quadrado (χ^2), e nos de múltipla escolha, comparados pelo teste de Friedman (Bioestat 5.3[®]; Ayres *et al.*, 2007). O nível de confiabilidade foi de 95%.

3.4 Bioensaios de campo

3.4.1 Efeito do antranilato de metila e do benzaldeído no forrageamento de *Apis mellifera*

Os bioensaios foram executados no Campus da Faculdade de Agronomia em Porto Alegre, RS (30°01'S; 51°13'O) entre os meses de outubro a dezembro de 2014, em dias com temperatura entre 20 e 30 °C e sem registro de pluviosidade.

Em cada bateria de teste foram utilizados 2 mL de BZA ou AME puros, pipetados individualmente em discos de papel filtro (Whatman, 80g/m²) com diâmetro de 10 cm. Esses discos foram colocados dentro de placas de Petri (13 cm de diâmetro), sendo que na porção central de cada placa foi adicionado um alimentador contendo 40 mL com solução de mel (25%) (Figura 3A). As placas foram posicionadas sobre estacas a uma altura de 80 cm do solo e distanciadas de, aproximadamente, 10 metros de colônias de *A. mellifera*. Como controle foi utilizado placa contendo disco de papel filtro e alimentador

com a solução de mel. Realizou-se uma repetição por dia com cada substância, totalizando 30 réplicas. Os bioensaios foram avaliados por 30 minutos, entre as 10 e 12 horas.

As abelhas que se alimentavam durante as visitas eram contabilizadas e marcadas com tinta atóxica (caneta UniPOSCA™), com cores distintas por tratamento (Figura 3B).

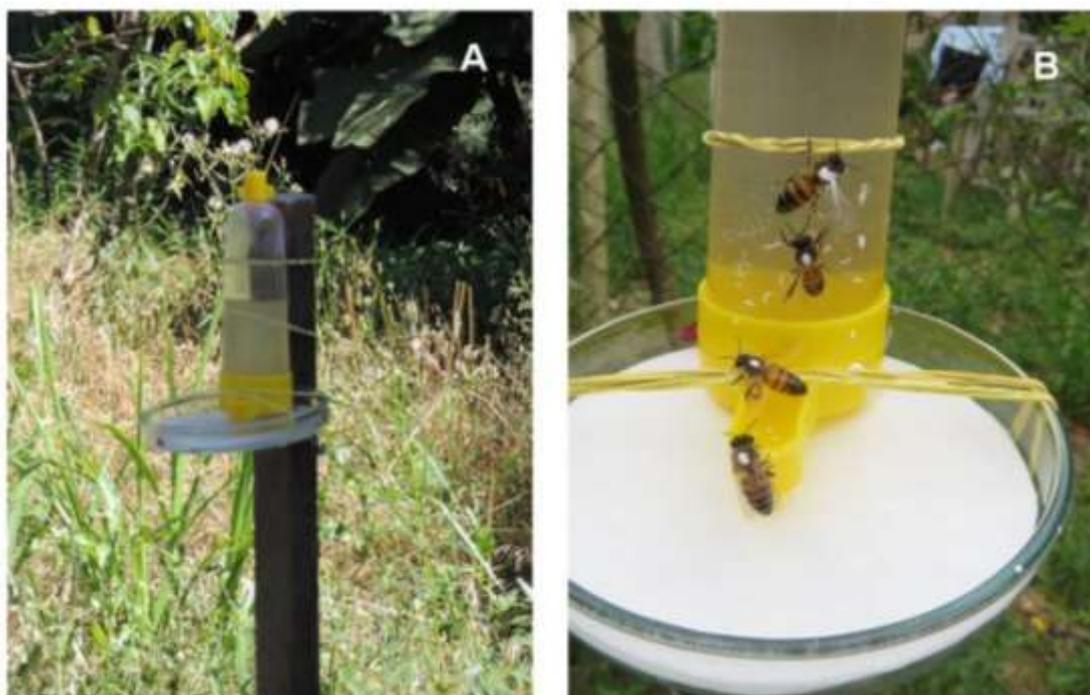


FIGURA 3. Dispositivo de teste. A) alimentador contendo solução de mel e placa de Petri com papel filtro fixados em estaca; B) abelhas marcadas no tratamento controle

O número médio de abelhas que visitaram e se alimentaram do mel presente em cada tratamento foram testados quanto à normalidade, submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade (BioEstat, 5.3; Ayres *et al.*, 2007).

3.4.2 Influência da presença de compostos sintéticos no alojamento de enxames de *Apis mellifera* em caixas isca

Os bioensaios foram realizados em duas áreas, na propriedade Pôr-do-Sol situada no município de Minas do Leão, RS (30°06'26"S, 52°01'04" O) e na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, localizada em Eldorado do Sul, RS (30°05'52"S, 51°39'08" W). A área experimental de Minas do Leão (Figura 4B) possui cerca de 2 ha, com superfície no entorno coberta por campo nativo e cultivo de eucalipto (*Eucalypto grandis*). A área de Eldorado do Sul (Figura 4C) possui 1,6 ha com campos de pastagens naturais, áreas de eucalipto, além de culturas anuais como soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), no entorno. Em ambos os locais havia a presença de apiários que se encontravam a uma distância aproximada de 150 m das áreas experimentais.

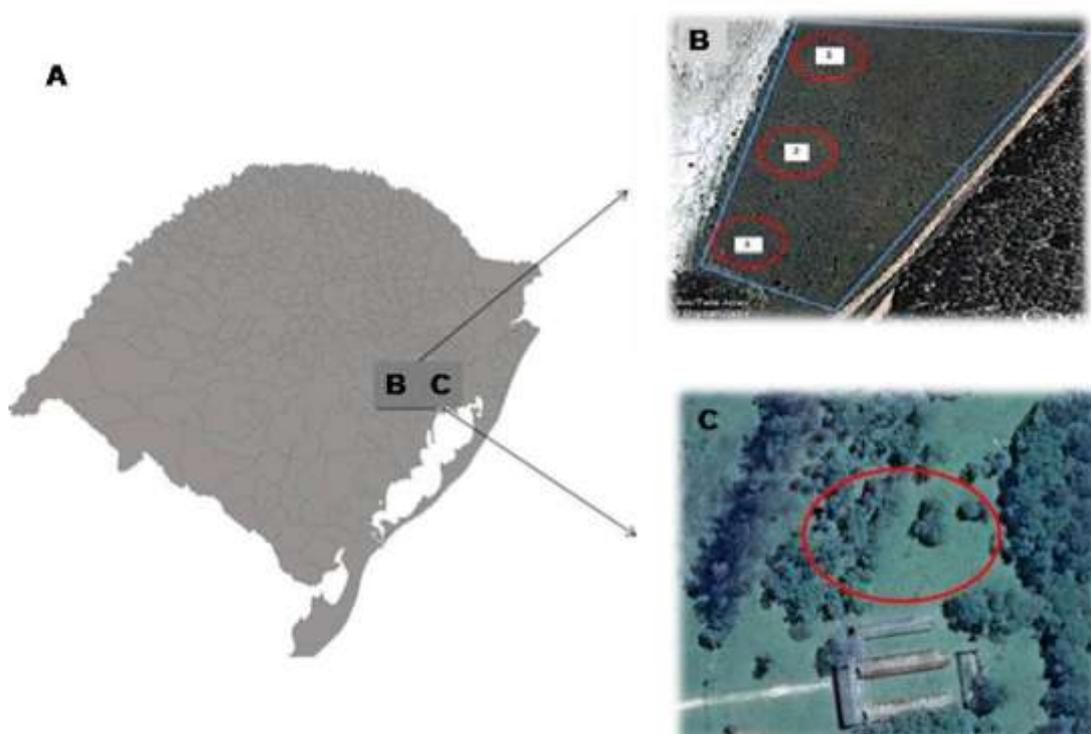


FIGURA 4. Mapa do Rio Grande do Sul (A) e vista aérea das áreas experimentais: Minas do Leão (B) e Eldorado do Sul (C), RS. Círculos vermelhos delimitam as três áreas na propriedade Pôr-do-Sol (B) e a área parcial na Estação Experimental Agronômica da UFRGS (C) (Google Earth, 2015)

O período de avaliação foi de 16 de outubro de 2013 a 15 de maio de 2014, na área B e de 03 de janeiro de 2014 a 15 de maio de 2014, na área C.

Foram utilizadas caixas isca confeccionadas com papelão branco com cobertura metalizada, seguindo as medidas dos núcleos padrão Langstroth com capacidade para cinco quadros de ninho (caixilhos), com volume de 35 L. No interior de cada uma das caixas eram colocados apenas dois caixilhos, centralizados, contendo uma tira de cera alveolada, com dimensões de 42 cm de comprimento e 5 cm de altura, fixados na barra superior do mesmo. Todas as caixas isca foram cobertas e protegidas da chuva por sacos plásticos (Figura 5).



FIGURA 5. Caixa isca com enxame de *Apis mellifera* na área experimental no município de Minas do Leão – RS.

As caixas isca foram posicionadas no chão distantes 5 m entre si e iscadas com um dos seguintes tratamentos: formulação comercial do FNS (Swarm Catch Lure Contech Inc.), óleo essencial de capim limão, benzaldeído e antranilato de metila. As três últimas foram formuladas em emulsão de parafina (1g) na concentração de 10%, conforme item 3.1. Os tratamentos

foram colocados no interior das caixas isca e renovados a cada 30 dias. Foram feitas seis repetições por área, divididas em três subparcelas com duas caixas/tratamento.

A inspeção era realizada semanalmente e, quando verificada a presença de abelhas alojadas, as caixas eram fechadas e recolhidas do local, sendo uma nova, com o respectivo tratamento, instalada em outro local, dentro da subparcela.

O número médio de enxames de *A. mellifera* coletados nas caixas iscas contendo os diferentes tratamentos foi testado quanto à normalidade e submetidos à ANOVA sendo as diferenças comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (BioEstat, 5.3; Ayres *et al.*, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Respostas eletetroantegráficas

4.1.1 Testes de sensibilidade e seletividade

As curvas de respostas às concentrações obtidas a partir de bioensaios eletroantegráficos (EAGs) de antenas de *A. mellifera* com idade entre 20-30 dias, ao feromônio de Nasonov sintético (FNS), óleo essencial de capim limão (OCL), benzaldeído (BZA) e antranilato de metila (AME) estão representadas nas figuras 6 a 9, respectivamente.

O limiar de resposta para o FNS foi atingido em concentrações de aproximadamente 0,1 µg /µL (Figura 6), ou seja, menores do que para o OCL BZA e AME (~10 µg/µL), figuras de 7 a 9, respectivamente (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Concentrações abaixo dos referidos valores, foram similares ao controle (etanol) (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$).

No presente estudo as respostas eletroantegráficas de *A. mellifera* a cada um dos compostos (seletividade) não diferiram entre operárias jovens e velhas (Mann-Whitney; $P > 0,05$). As antenas de abelhas com idade entre um e cinco dias desencadearam respostas significativamente maiores aos tratamentos OCL e ao FNS em relação ao controle. Nas mais velhas, além dos dois compostos citados, foi observada uma resposta maior também para o benzaldeído, quando em comparação ao controle (Tabela 1).

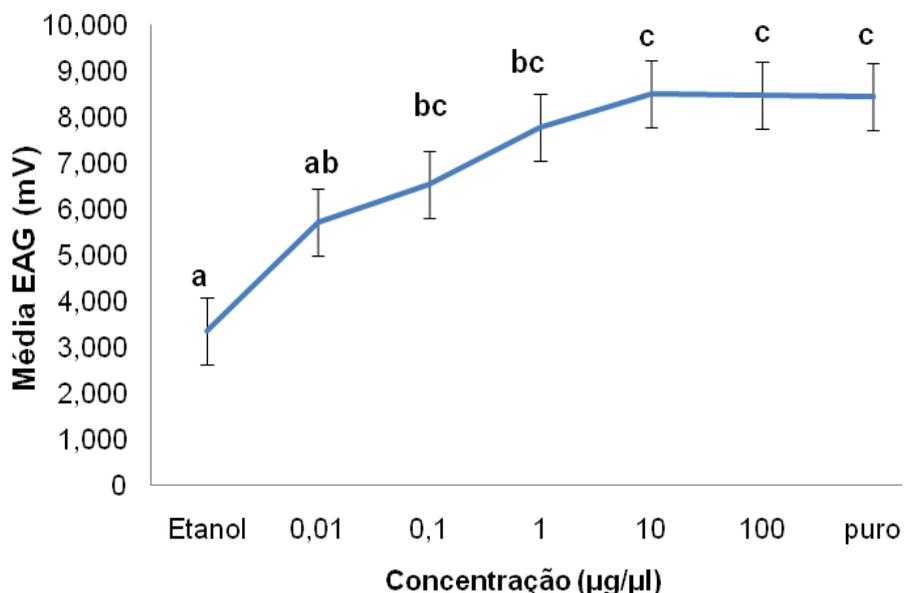


FIGURA 6. Respostas eletroantenográficas (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações do feromônio de Nasonov sintético: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

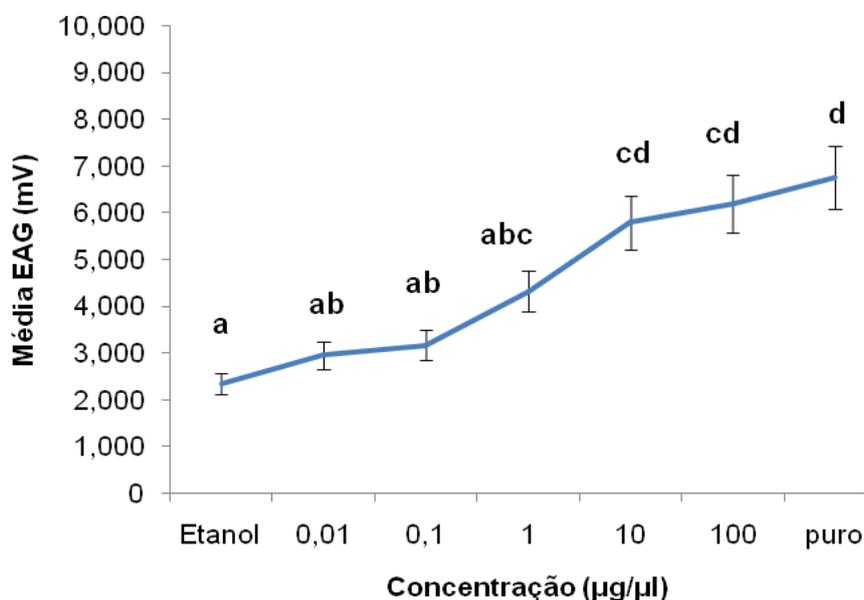


FIGURA 7. Respostas eletroantenográficas (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações do óleo de capim limão: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

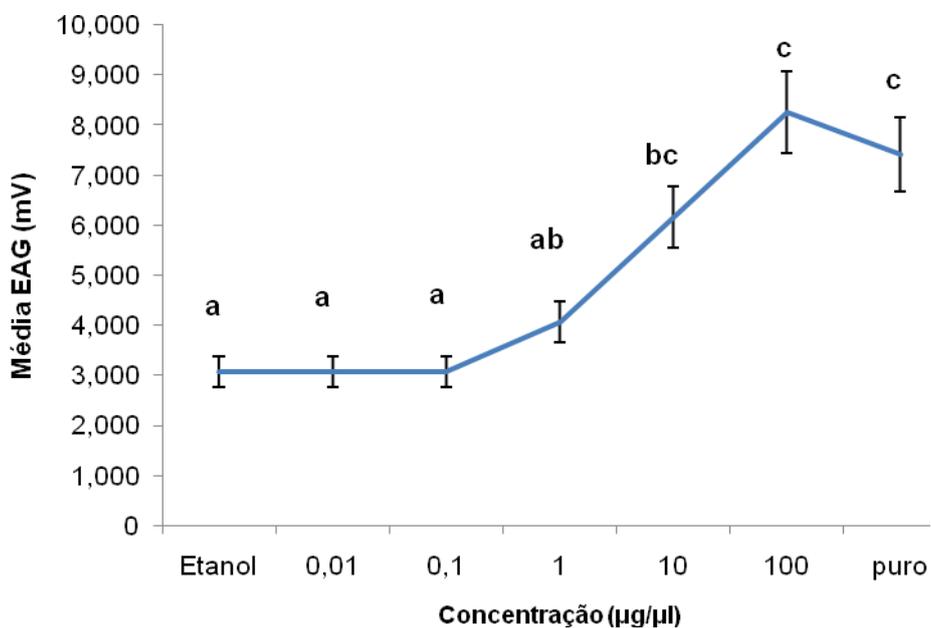


FIGURA 8. Respostas eletroantegráficas (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações de benzaldeído: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

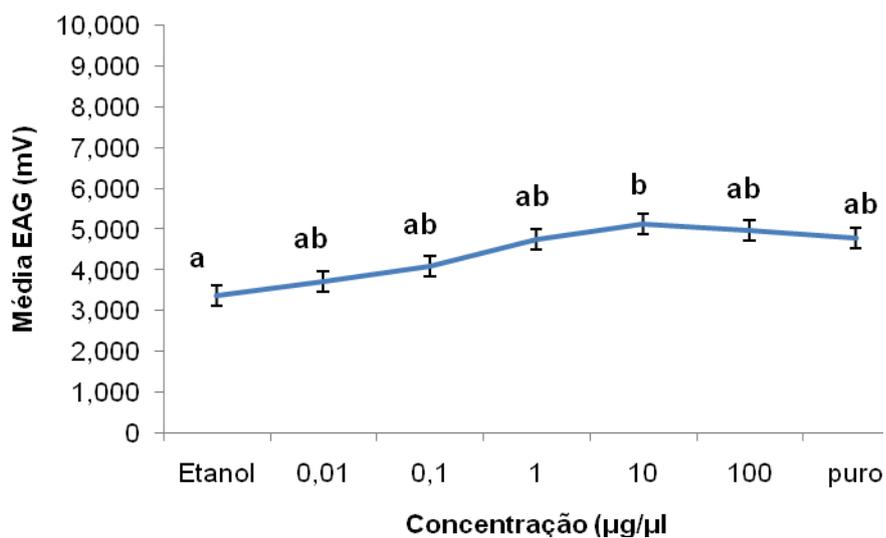


FIGURA 9. Respostas eletroantegráficas (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações de antranilato de metila: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

TABELA 1. Respostas eletroantenográficas (mV) de abelhas em dois grupos de idade (1-5 e 20-30 dias) aos tratamentos, em papel filtro, com óleo essencial de capim limão (OCL), feromônio de Nasanov sintético (FNS), benzaldeído (BZA), antranilato de metila (AME) e etanol (controle) (n = 15).

Tratamento	Idade das operarias (dias) (resposta em mV± EP)	
	1-5	20-30
OCL	12,14 ± 1,21 ABa*	11,32 ± 0,83 Aa
FNS	11,12 ± 1,32 ABa	10,44 ± 0,84 Aa
BZA	10,12 ± 1,20 BCa	9,90 ± 0,90 ABa
AME	8,65 ± 1,25 BCa	6,98 ± 0,70 BCa
Etanol (controle)	6,07 ± 0,56 Ca	4,12 ± 0,51 Ca

*Médias seguidas de letras distintas maiúsculas, nas colunas e minúsculas, nas linhas, diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

As sensilas olfativas de *A. mellifera* tem a capacidade de responder a diversos odores, com células mais sensíveis a alguns tipos de compostos em detrimento de outros (Fonta *et al.* 1991; Leal, 2005). Nesse trabalho constatou-se que todos os odores testados foram percebidos pelas antenas das abelhas, apesar das diferenças no limiar e na intensidade de respostas observadas.

De forma geral, as maiores despolarizações foram observadas para o tratamento FNS e para o OCL (que contem substâncias análogas ao FNS), porém, o limiar foi menor para o primeiro, indicando que as abelhas são mais sensíveis a ele. As maiores respostas das abelhas aos estímulos com OCL e FNS, em relação ao controle, estão relacionadas, provavelmente, ao maior número de proteínas receptoras específicas de feromônio na hemolinfa antenal destes insetos. Este fato se deve a importância da percepção destes odores na

comunicação química das abelhas e, conseqüentemente, na organização da colônia (Free, 1987).

Segundo Thiéry & Marion-Poll (1998) o tamanho das respostas eletrofisiológicas depende da familiaridade do composto na rotina dos insetos e que estas estão diretamente vinculadas ao efeito da substância no comportamento dos mesmos. O feromônio de Nasonov é responsável pela orientação, aglomeração e forrageamento, auxiliando as abelhas a encontrarem sítios de alimentação e de nidificação (Hepburn, 2011). Do mesmo modo, o óleo essencial de capim limão, por ter substâncias análogas ao FNS, como o citral e o geraniol, também pode desencadear comportamentos semelhantes em operárias, independentemente da idade destas (Veturiano & Monteiro, 2006).

Allan *et al.* (1987), através de EAG, avaliaram o efeito dos compostos feromonais presentes nas glândulas mandibulares de rainhas (9-hidroxi-2-decenóico, 9-ceto-(*E*)-2-decenóico, 9-keto-(*E*)-2-decenóico) e dos compostos do feromônio de alarme (acetato de octila, acetato de octila, álcool benzílico, (+)-nonan-2-ol, (±)-nonan-2-ol, Eicos -11Z-en-1-ol) em operárias de *Apis mellifera ligustica* L. com idade entre 1 a 60 dias. Segundo os autores não houve um acréscimo no tamanho das respostas eletroantegráficas em função da idade.

Resultado semelhante foi observado por Masson & Arnold (1984) ao testarem as respostas de antenas de operárias de *A. mellifera* (raça europeia) desde a emergência até 22 dias de idade. Os autores observaram que a despolarização das sensilas olfativas atingiu seu máximo no 4^o dia,

permanecendo inalterada até os 22. Estes resultados corroboram os encontrados nesse trabalho, onde não foram observadas diferenças no tamanho das respostas (mV) a todos os odores quando comparados grupos de 1-5 e de 20-30 dias de idade.

Sabe-se que a percepção de odores é importante para a coesão e orientação das abelhas dentro e fora da colmeia, ou seja, para que o superorganismo sobreviva é necessário que a percepção olfativa seja igual para todos os membros da casta operária de *A. mellifera*. Desde a fase larval até a adulta, as abelhas são sucessivamente submetidas a odores diferentes, como aqueles emitidos pelas crias, pelas irmãs adultas, pela rainha e/ou pelos alimentos armazenados. Após seu primeiro voo de orientação, a abelha também é submetida a uma enorme variedade de pistas químicas, entre estas, os complexos e instáveis voláteis florais (Masson *et al.*, 1993).

As operárias memorizam os odores que são de interesse e conseguem reconhecer substâncias chave entre uma gama de substâncias, que podem estar sinalizando, por exemplo, para os recursos alimentares. Nesse sentido, as abelhas de faixas etárias distintas devem estar igualmente sensíveis as principais substâncias, tanto àquelas utilizadas no reconhecimento dos integrantes da mesma colônia, quanto às dos recursos que estão no entorno (Masson *et al.*1993).

Assim como constatado nos bioensaios com as substâncias testadas em papel, foi observado que o OCL e FNS também desencadearam maiores respostas eletroantegráficas em campeiras nos tratamentos com emulsão de parafina, independentemente do tempo de exposição (Tabela 2). De forma

geral, não houve diferença, com exceção do BZA, entre as despolarizações de antenas de *A. mellifera*, submetidas às emulsões novas em comparação com as expostas por oito semanas. Esse resultado pode ser decorrente das interações químicas entre a matriz dispersora e os ingredientes ativos (compostos) com a taxa de liberação similar para os mesmos. Porém, o benzaldeído foi o único tratamento em que se observou a diminuição das respostas eletrofisiológicas ao longo do tempo. Este resultado pode estar relacionado à maior volatilidade desse composto em relação aos demais e também ao fato deste aldeído se oxidar a ácido benzóico na presença do ar, resultando em uma substância não volátil (Peter *et al.*, 2006; Aldrich, 2012).

TABELA 2. Respostas eletroantegráficas (mV) (\pm EP) de *Apis mellifera* campeiras, aos compostos sintéticos: antranilato de metila (AME), benzaldeído (BZA), óleo essencial de capim limão (OLC), formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure.) e a emulsão de parafina (controle), expostos por até oito semanas em condições de campo (20 ± 5 °C, $70 \pm 10\%$ UR) (n = 18).

Tratamento	Exposição das substancias em condições de campo (semanas) (mV \pm EP)							
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta	Sexta	Sétima	Oitava
Controle	1,54 \pm 0,26 Aa	3,74 \pm 0,26 Abc	5,64 \pm 0,54 Ab	4,18 \pm 0,34 Ab	3,38 \pm 0,24 Ab	1,97 \pm 0,25 Aac	2,44 \pm 0,20 Aac	2,36 \pm 0,21 Aac
AME	3,12 \pm 0,51 ABa	3,70 \pm 0,29 Aab	4,17 \pm 0,47 Aab	6,59 \pm 0,78 ABc	5,13 \pm 0,34 ABc	4,22 \pm 0,61 ABab	3,24 \pm 0,29 Aab	2,89 \pm 0,20 Aab
BZA	6,00 \pm 0,89 Ba	5,72 \pm 0,38 Ba	3,96 \pm 0,92 Aabc	3,92 \pm 0,51 Aab	3,08 \pm 0,41 Abc	2,15 \pm 0,28 Abc	2,14 \pm 0,38 Ac	2,30 \pm 0,31 Abc
OLC	5,98 \pm 0,87 Ba	5,92 \pm 0,47 BCa	8,46 \pm 1,01 Bb	8,43 \pm 1,19 Bb	8,56 \pm 0,76 Bb	6,27 \pm 0,85 Bab	6,12 \pm 0,53 Bab	4,91 \pm 0,40 Ba
FNS	8,94 \pm 1,41 Bab	9,13 \pm 0,76 Cab	12,05 \pm 1,11 Cb	10,19 \pm 1,12 Bab	8,39 \pm 0,56 Bab	7,20 \pm 0,97 Bab	6,49 \pm 0,75 Ba	6,62 \pm 0,56 Ba

*Médias seguidas de letras maiúscula na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P < 0,05).

4.2 Bioensaios comportamentais

4.2.1 Olfatometria

Nos bioensaios em olfatômetro tipo “Y”, as operárias nutrízes ($\chi^2 = 9,8$; gl = 1; P = 0,0017) e campeiras ($\chi^2 = 12,8$; gl = 1; P = 0,0003) de *A. mellifera* africanizadas foram significativamente mais atraídas para o FNS na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando comparado ao controle (etanol), não havendo diferenças de respostas entre abelhas de idades diferentes ao FNS ($\chi^2 = 0,036$; gl = 1; P = 0,8488) (Figura10).

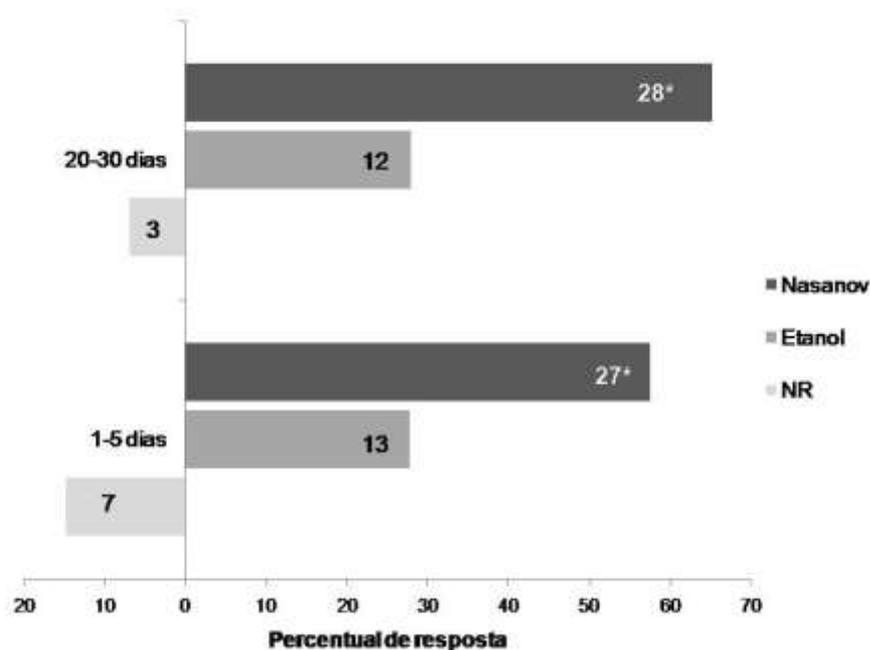


FIGURA 10. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade, testadas em olfatômetro de dupla escolha e submetidas ao feromônio de Nasanov sintético (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e etanol (controle), em papel filtro. *O número de abelhas que se direcionaram ao feromônio de Nasanov difere significativamente do controle (χ^2 ; P < 0,05). NR = Não Responsivos.

Desde a fase imatura as abelhas estão expostas aos compostos feromonais de seus coespecíficos e é de se esperar que na fase adulta elas

sejam igualmente sensíveis a estes (Masson *et al.*, 1993). Resultado semelhante ao deste estudo, também com substâncias feromonais, foi encontrado por Pham-Delégue *et al.* (1993) que ao testarem grupos de abelhas em olfatômetro de quatro escolhas com idades de 2, 4, 8, 15 e 21 dias ao feromônio natural e sintético da rainha de *A. mellifera*, não observaram diferença significativa no tamanho das respostas entre operárias de diferentes idades. Willians *et al.* (1982) avaliaram, em olfatômetro, a atratividade de abelhas europeias ao feromônio natural de Nasonov e ao sintético e também não observaram diferença na atratividade entre os tratamentos.

Abelhas operárias podem ser observadas na entrada de colmeias com o abdômen levantado agitando as asas e expondo a glândula feromonal. Através desse comportamento, estas liberam o feromônio de Nasonov orientando os demais indivíduos da sua colônia que estão sobrevoando o local. Esse processo também pode ser observado em enxames de abelhas que estão pousados, ou seja, enquanto algumas operárias voam para buscar água para as irmãs que estão aglomeradas, outras sinalizam com feromônio a posição do enxame (Lindauer, 1951; Schimdt, 1994; Sandoz *et al.*, 2007).

O feromônio de Nasonov também pode ser utilizado na marcação de sítios de nidificação. Quando, na época reprodutiva, as abelhas estão em busca de um novo local para se alojarem, elas marcam os locais que consideram apropriados com esse feromônio. Posteriormente, voltam à colônia, ou ao enxame de onde partiram, e informam às demais sobre a localização do achado (Schimdt, 1994; Sandoz *et al.*, 2007).

Nesse presente estudo foi utilizado Swarm Catch Lure, que é uma isca comercial usada para a captura de enxames de abelhas de raças europeias. Com os resultados deste trabalho constatamos que as abelhas africanizadas, assim como as europeias, também são atraídas a esta isca. Os resultados dos bioensaios de olfatometria também mostraram que aproximadamente 60% das campeiras se direcionaram ao tratamento contendo o OCL (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), em relação aos 32 % que foram para o controle ($\chi^2 = 7,2$; gl = 1; P= 0,0073), o mesmo foi observado quando foram utilizadas abelhas com um a cinco dias de idade ($\chi^2 = 7,2$; gl = 1; P= 0,0073) (Figura 11).

Quando foi contrastado o comportamento quimiotático de campeiras frente ao OCL e ao FNS, em papel filtro, ambos na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, registraram-se um número semelhante de abelhas em cada um deles ($\chi^2 = 0,200$; gl = 1; P = 0,6547). Esse resultado pode ser explicado pelo fato do OCL ter em sua composição os compostos como o geraniol e nerol que também estão presentes no feromônio de Nasonov (Pickett *et al.*, 1980).

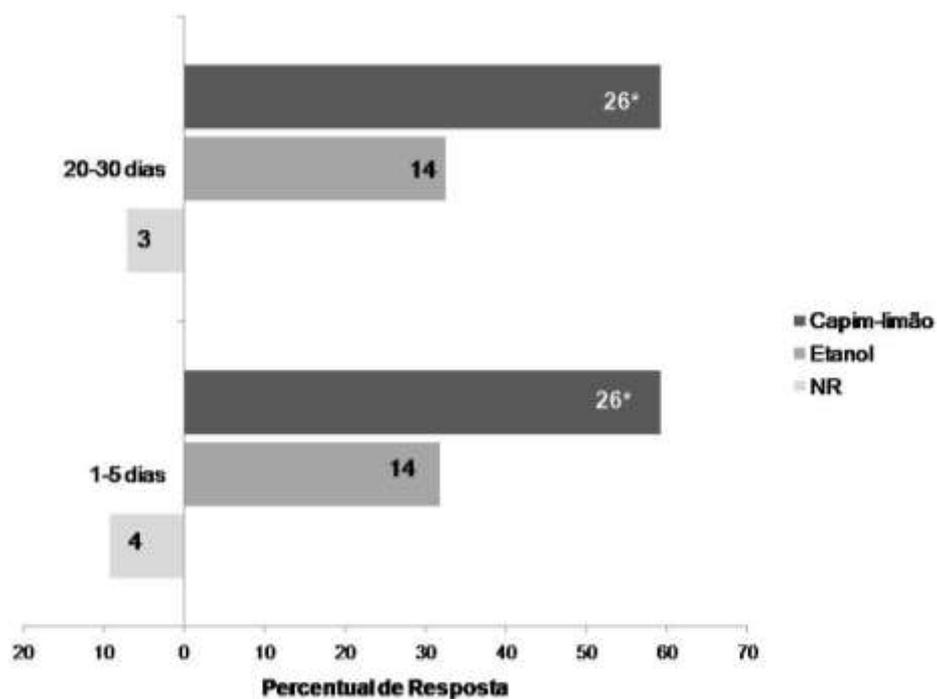


FIGURA 11. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade, testadas em olfatômetro de dupla escolha e submetidas ao óleo essencial de capim limão (OCL) (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e etanol (controle) em papel filtro. *O número de abelhas que se direcionaram ao OCL difere significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$). NR = Não Responsivos.

Os resultados de quimiotaxia constatados neste estudo evidenciaram que a maior percepção ao OCL em relação ao controle, observada nos EAGs (4.1.1), está associada à resposta motora positiva das abelhas a este tratamento.

Resultado semelhante foi observado por Malerbo-Souza *et al.* (2004) em condições de campo. Segundo os autores, a pulverização de óleo essencial de capim limão em pomares de laranja doce (*Citrus sinensis*), aumentou o número de visitas de *A. mellifera* em comparação com o tratamento controle. No entanto, quando as plantas foram pulverizadas com uma mistura de eugenol, citral e geraniol (sendo os dois últimos presentes

no feromônio de Nasanov) foi observado um maior número de abelhas, em relação as que receberam o óleo de capim limão.

Extratos de capim limão, manjericão, falsa-melissa, folha de laranjeira e de eucalipto, todos a 20%, foram pulverizados isoladamente nas flores, em culturas de abacateiro (Silva *et al.*, 2002) e de maracujazeiro (Malerbo-Souza, *et al.* 2003) para avaliar o número de visitas de abelhas no período de floração. Contudo, ao contrario do trabalho anterior, não foi observado aumento significativo nas visitas dos insetos nas flores pulverizadas em relação ao tratamento controle, em ambas as culturas.

No presente estudo, quando foi utilizado o OCL na concentração resposta (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), também não foi observada a atratividade motora positiva de *A. mellifera* a este tratamento, ao contrário, as abelhas preferiram se deslocar para o local onde estava o etanol (controle) ($\chi^2 = 5$; gl = 1; P = 0,0253) evidenciando que o comportamento quimiotático pode ser influenciado pela concentração do composto utilizado, conforme já registrado por Wright *et al.* (2009).

Dessa forma supõe-se que concentrações próximas de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ do OCL podem provocar a saturação das proteínas receptoras das antenas de operárias de *A. mellifera*, podendo também interferir na interpretação neurofisiológica do inseto em relação ao estímulo olfativo exposto, fazendo com que este odor deixe de ser atrativo para as abelhas.

Nos bioensaios realizados em olfatômetro de quatro escolhas com antranilato de metila (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e etanol (controle), foi observado um maior tempo de residência no braço do olfatômetro que continha o etanol, em

relação aos outros três braços da arena ($P < 0,05$) com AME (Figura 12). Esse resultado indica que o composto na concentração utilizada exerceu ação repelente nas abelhas.

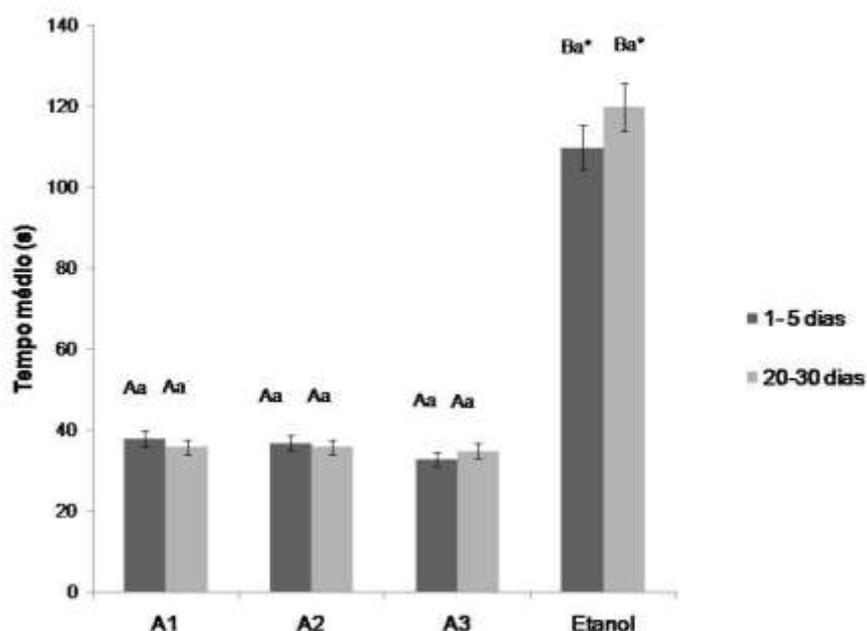


FIGURA 12. Tempo de residência (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* com idade entre 1-5 e 20-30 dias de idade, nos braços do olfatômetro de quatro escolhas contendo antranilato de metila (A1, A2 e A3) ($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou etanol. *Colunas de mesma cor seguidas de letras maiúsculas, e de cores diferentes, dentro de cada tratamento, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si, pelo teste de Friedman ($\alpha = 0,05$). Tempo de observação: 5 min

O comportamento desencadeado por AME já foi registrado para abelhas, dentre outros himenópteros e dípteros. De acordo com Pankiw (2009) o antranilato de metila a 10% aspergido na vestimenta do pesquisador, reduziu o número de ferroadas durante um ataque de *A. mellifera*. Também foi observado pelo autor uma diminuição na quantidade de ninhos de vespas do gênero *Polistes* em locais onde foram instalados dispersores contendo esta substância pura.

Compostos do grupo antranilato (antranilato de etila, antranilato de butila e antranilato de dimetila) também foram descritos em testes

laboratoriais como repelentes de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Kain *et al.*, 2013) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Afify *et al.*, 2014).

De forma contrária, Murai *et al.* (2000) constataram que o antranilato de metila foi atraente para *Thrips hawaiiensis* Morgan (1913) (Thysanoptera: Thripidae) e *Thrips coloratus* Schmutz (1913) (Thysanoptera: Thripidae), bem como, para o parasitoide *Ceranisus menes* (Hymenoptera: Eulophidae). Simpson *et al.* (2011) pulverizaram antranilato de metila em três diferentes concentrações (0,5%, 1% e 2%) e culturas (*Vitis vinifera* L., *Zea mays* L., *Brassica oleracea* L.) e observaram que um dia após a aplicação do produto foram atraídos os predadores das seguintes espécies: *Dicranolaius bellulus* (Coleoptera: Melyridae), *Micromus tasmaniae* (Neuroptera: Hemerobiidae), *Nabis kinbergii* (Neuroptera: Nabidae) e *Oeachalia schellenbergii* (Hemiptera: Pentatomidae), além de uma morfoespécie de Encyrtidae, após o quarto dia da pulverização. O AME é um composto secundário que pode ser liberado por plantas danificadas por insetos fitófagos (Murai *et al.*, 2000; Pankiw, 2009). Dessa forma, provavelmente a atração dos predadores e parasitoides pode estar relacionada à presença de herbívoros (presas ou hospedeiros), na área onde o composto foi liberado.

Esta substância também está presente em flores de citros e já foi utilizada para caracterizar a origem floral de méis provenientes de espécies desse gênero (Sesta *et al.*, 2008). Portanto, o AME é familiar para *A. mellifera* as quais podem reagir de forma diferente na presença deste composto, de acordo com a concentração exposta, como relatado e observado neste estudo.

As abelhas, logo após a emergência, são submetidas a odores dentro da colmeia, inclusive aos dos alimentos armazenados como pólen e néctar. Como o antranilato de metila está presente em flores de origem cítrica, é de se esperar que tanto abelhas nutrizes, como campeiras sejam igualmente perceptíveis a esse odor.

Em relação ao tratamento com benzaldeído (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), o tempo de residência despendido nos braços da arena correspondente ao tratamento controle (etanol), foi maior ($P < 0,05$), tanto para operárias novas como velhas, evidenciando a repelência deste composto, nesta concentração, para abelhas africanizadas (Figura 13). O BZA também foi reportado como repelente para formigas (Eisner *et al.*, 1978; Eisner *et al.*, 2005) e *A. mellifera* (Townsend, 1963).

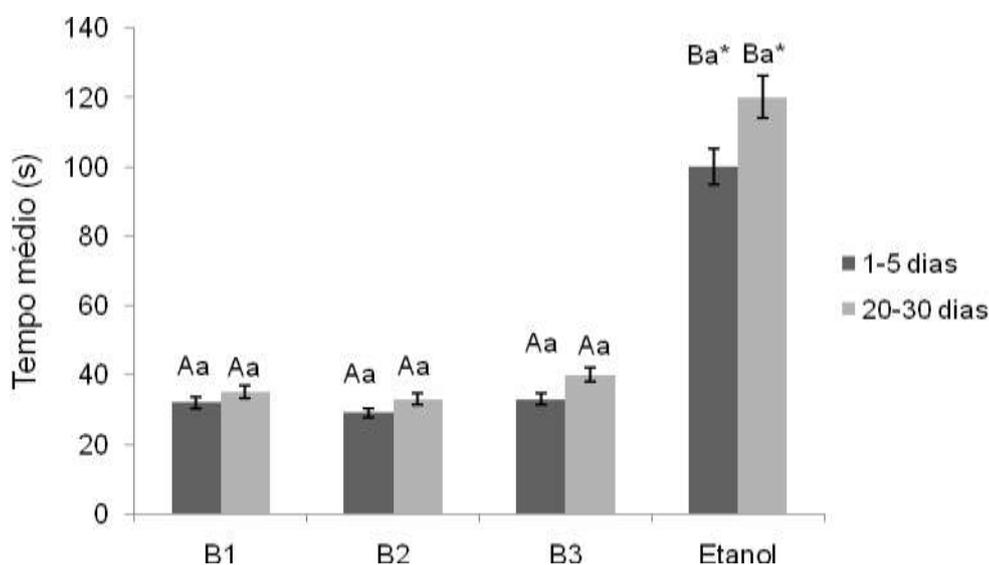


FIGURA 13. Tempo de residência (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* com idade entre 1-5 e 20-30 dias de idade, nos braços do olfatômetro de quatro escolhas contendo benzaldeído (B1, B2, B3) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou etanol. *Colunas de mesma cor seguidas de letras maiúsculas, e de cores diferentes, dentro de cada tratamento, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem entre si, pelo teste de Friedman ($\alpha = 0,05$). Tempo de observação: 5 min.

Corroborando os dados obtidos neste estudo, Townsend (1963) também constatou, em laboratório e campo, que o benzaldeído e o benzoato de metila provocaram um percentual de repelência de 85 e 81%, respectivamente, em abelhas europeias. Segundo Bargamann (1993), o BZA também pode desencadear respostas comportamentais diferentes de acordo com a concentração utilizada. Cossé e Baker (1999), por exemplo, observaram que esse composto é atraente para *Diabrotica* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) somente em altas concentrações (> 200 mg/ 25°C), em baixas, esta substância não altera o comportamento quimiotáxico destes insetos.

Foram realizados bioensaios para avaliar as respostas quimiotáxicas de *A. mellifera* campeiras, em função do tempo de exposição dos dispersores: feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure, Contech Inc.) e emulsão com OCL, BZA ou AME.

As abelhas foram mais atraídas para os tratamentos com o FNS, em relação ao controle, independentemente do tempo de exposição da formulação (Figura 14). Esse resultado indica que esta permaneceu estável e atrativa para as abelhas ao longo de todo o período, reforçando os resultados encontrados nos testes de eletroantenografia (Tabela 2).

Em relação ao OCL, foi verificada a atratividade para campeiras até a quinta semana de exposição ($\chi^2 = 7,2$; gl = 1; P = 0,0073) (Figura 15). A partir da sexta semana, o percentual de escolhas das abelhas não diferiu significativamente. Sendo assim, a formulação de capim limão se manteve atraente por um período máximo de cinco semanas em testes quimiotáxicos. Já nos EAGs, a formulação se manteve perceptível para as abelhas até a

oitava semana. Segundo Masson *et al.* (1993) as abelhas podem apresentar respostas eletroantenográficas a determinados estímulos, mas não motora, uma vez que é necessário uma equalização entre o odor percebido e a respectiva interpretação do sinal no lóbulo antenal e, posteriormente, no deutocérebro para desencadear o comportamento.

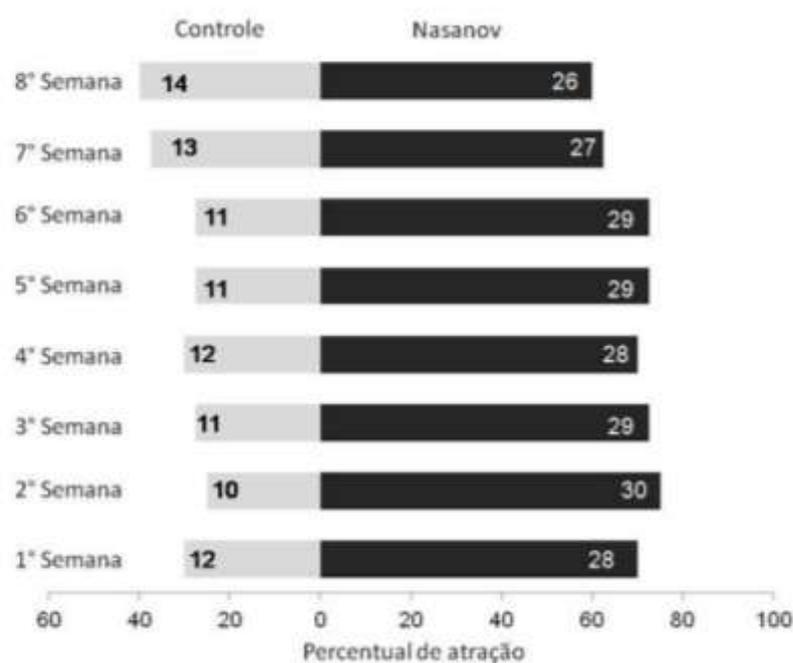


FIGURA 14. Respostas quimiotáticas (%) de operárias de *Apis mellifera* com idade de 20-30 dias, testadas em olfatômetro de dupla escolha, submetidas à formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure) e controle (tubo Eppendorf vazio) expostos ao ambiente por até oito semanas. Todas as respostas ao FNS diferiram significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$).

Tanto a formulação contendo antranilato de metila, quanto benzaldeído, expostas por até oito semanas, apresentaram ação repelente para as abelhas. O tempo médio das campeiras em ambos os tratamentos foi maior para o tratamento controle (Friedman, $P < 0,05$), quando comparado ao tempo despendido nas arenas que continham o AME ou o

BZA, separadamente. A percepção a estes compostos durante este período, já tinha sido constatada nos testes de eletroantenografia (Tabela 2).

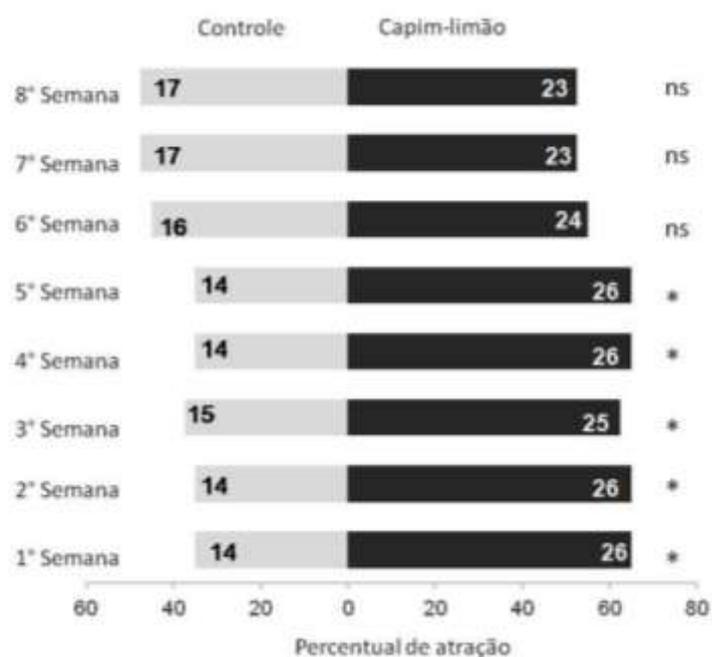


FIGURA 15. Respostas quimiotáticas (%) de operárias de *Apis mellifera* com idade de 20-30 dias, testadas em olfatômetro de dupla escolha, submetidas ao óleo de capim limão (OCL) (10%), em emulsão de parafina, e ao tratamento controle (emulsão inerte). *Respostas ao OCL seguidas de asteriscos diferem significativamente do controle (χ^2 ; $P < 0,05$). ns = não significativo.

4.3 Bioensaios de campo

4.3.1 Efeito do antranilato de metila e do benzaldeído no forrageamento de *Apis mellifera*

Os resultados dos testes realizados a campo mostraram que tanto o AME quanto o BZA apresentaram efeito repelente às abelhas. O número médio de indivíduos que visitaram os alimentadores contendo a solução de mel a 25%, na presença dos compostos puros, foi significativamente menor quando comparado com o controle (Tukey; $P < 0,05$). A média de visitantes

no alimentador contendo a solução de mel na presença do AME foi de $1,37 \pm 1,06$ e de seu controle foi de $9,3 \pm 2,59$. Já no benzaldeído foi de $1,17 \pm 1,21$ em relação ao controle $7,13 \pm 2,3$.

Segundo Menzel (1999), as abelhas associam recompensas (xarope de açúcar, por exemplo) com odores de plantas e podem desenvolver respostas condicionadas quando estimuladas a esses odores. No entanto, no presente estudo, observou-se que apenas 9% das abelhas que visitaram o alimentador contendo a solução com mel na presença do antranilato de metila retornaram ao mesmo pela segunda vez, enquanto que no alimentador controle (solução de mel), o número de retornos foi de aproximadamente 50%. Já no alimentador tratado com o BZA, 17% das abelhas que consumiram a solução de mel retornaram para uma segunda visita, enquanto que no controle, 51% das campeiras revisitaram-no. Nossos resultados corroboraram os de Townsend (1963), que registrou o efeito de repelência do benzaldeído em operárias de *A. mellifera*.

Free *et al.* (1989) também constataram que um outro composto do grupo benzila (acetato de benzila) desencadeou comportamento de repelência de *A. mellifera* em plantas de girassol (*Heliantus annuus* L.) quando utilizado nas concentrações de 0,5 e 5 mg/100 μ L em parafina líquida).

4.3.2 Influência da presença de compostos sintéticos no alojamento de enxames de *Apis mellifera* em caixas isca

O número de enxames de *A. mellifera* africanizadas capturados nas caixas isca contendo o FNS (Swarm Catch Lure Contech Inc.) foi significativamente maior do que nas caixas iscadas com qualquer um dos

outros tratamentos (ANOVA; $P < 0,05$), tanto em Eldorado do Sul-RS, como em Minas do Leão-RS. O número de enxames capturados nas caixas isca que continham os demais tratamentos, incluindo o controle, foi semelhante (Tabela 3).

TABELA 3. Número médio (\pm EP) de enxames de *Apis mellifera* coletados em caixas isca com os compostos sintéticos: antranilato de metila (AME), benzaldeído (BZA), óleo essencial de capim limão (OCL), formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (Swarm Catch Lure) e o controle, nas áreas experimentais de Eldorado do Sul (RS) e Minas do Leão (RS), no período de outubro de 2013 a maio de 2014.

Tratamento	Número médio de enxames (\pm EP)		
	Eldorado do Sul	Minas do Leão	Total
FNS	2,0 \pm 0,24a	4,0 \pm 0,40a	6,0 \pm 0,53a*
BZA	0,5 \pm 0,02a	2,0 \pm 0,47ab	2,5 \pm 0,69b
OCL	0,5 \pm 0,04a	1,5 \pm 0,05ab	2,0 \pm 0,24b
AME	0,5 \pm 0,02a	1,0 \pm 0,15b	1,5 \pm 0,06b
Controle	0a	1,0 \pm 0,14b	1,0 \pm 0,28b

* Letras distintas diferem entre si na coluna (ANOVA, $P < 0,05$).

Sabe-se que a escolha de um novo local para nidificação é decidido através de um “comitê de busca” de centenas de abelhas que inspecionam os locais. Ao retornar, elas executam uma dança indicando a distância e a qualidade do novo sítio (Lindauer, 1955; Seeley *et al.*, 2006). Segundo Seeley & Buhrmann (2001) quando há várias opções, o grupo decide pela qualidade do local. Nos nossos resultados, provavelmente a presença do odor do feromônio de Nasanov contribuiu para que os enxames preferissem as caixas com o FNS, em detrimento aos outros tratamentos.

O fato de que o número de enxames capturados nas caixas isca que continham os tratamentos OCL, antranilato de metila, benzaldeído e controle

tenha sido semelhante, pode estar associado ao tipo de formulação dos compostos. A emulsão de parafina utilizada como matriz dispersora pode ter diminuído ou aumentado a taxa de liberação dos voláteis, impedindo a ação repelente de AME e BZA em *A. mellifera* e a atraente do OCL. De fato, nas concentrações utilizadas nas caixas isca os compostos repelentes não interferiram negativamente na atração de abelhas, ao contrário dos resultados obtidos nos experimentos em que foram utilizados puros (item 4.3.1). Esse resultado demonstrou que a concentração do AME e do BZA são preponderantes na repelência de abelhas e devem ser ajustadas para essa finalidade. Quanto ao OCL, apesar de ter compostos semelhantes aos do feromônio de Nasanov (Pickett, 1980), este se diferenciou da isca comercial, provavelmente pela competitividade com os voláteis desta.

A formulação em base de parafina foi escolhida por ser utilizada comercialmente no controle e manejo de insetos, principalmente em técnicas de interrupção do acasalamento em lepidópteros, na qual um dos requisitos é obter uma formulação com uma taxa de liberação constante ao longo do tempo (Pastori *et al.*, 2008; Harter *et al.*, 2010). Atterholt *et al.* (1999) avaliaram cinco formulações e concluíram que a parafina é um bom veículo para a liberação controlada de feromônios sexuais de insetos. No mercado nacional são utilizados com sucesso emissores à base de ceras e óleos sob forma de pasta, denominados “SPLAT[®]” (Specialized Pheromone and Lure Application Technology) para a interrupção do acasalamento de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera, Tortricidae) (ISCA, 2015).

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições em que o trabalho foi realizado, é possível concluir que:

- o limiar de resposta eletroantegráfica de *Apis mellifera* africanizadas para o feromônio de Nasanov sintético é de 0,1 µg/µL e para o óleo essencial de capim limão, antranilato de metila e benzaldeído, de 10 µg/µL;
- o feromônio de Nasanov sintético e o óleo essencial de capim limão desencadeiam quimiotaxia positiva em abelhas, já o antranilato de metila e benzaldeído, comportamento de repelência, em olfatometria;
- abelhas com 1 a 5 dias e com 20 a 30 dias de idade percebem igualmente os odores do feromônio de Nasanov sintético, óleo essencial de capim limão, antranilato de metila e benzaldeído;
- antranilato de metila e benzaldeído puros, repelem *Apis mellifera* africanizadas em condições de campo;
- o feromônio comercial de Nasanov sintético (Swarm Catch Lure, Contech Inc.) atrai mais enxames de *Apis mellifera* em caixas iscas do que emulsões de parafina contendo 10% de

óleo essencial de capim limão, antranilato de metila ou benzaldeído.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os semioquímicos podem ser uma ferramenta importante para o manejo de abelhas, seja pelo potencial uso de voláteis repelentes ou atraentes.

Nesse estudo foi constatado que tanto o feromônio comercial de Nasanov como o óleo essencial de capim limão, são atrativos para *A. mellifera* africanizadas. Sendo assim, ambos poderiam ser utilizados em caixas isca, na captura de enxames de abelhas com este perfil genético e, posteriormente, direcionados para produção apícola.

O fato de o FNS ter capturado mais enxames do que o OCL nesta pesquisa, não inviabiliza ou descredibiliza a utilização do último como atrativo para enxames, uma vez que bioensaios de laboratório confirmaram a atratividade de abelhas nutrizas e campeiras a este composto. É possível que o uso isolado do capim limão, sem a presença do FNS, potencialize a atratividade de abelhas para caixas isca com OCL, pois a presença deste não seria camuflada pela do feromônio de Nasanov. No entanto, outros trabalhos devem ser conduzidos para validar esta hipótese.

É importante salientar que o feromônio comercial (Swarm Catch Lure, Contech Inc.) é um produto importado com preço aproximado de três dólares (Betterbee, 2015), além das taxas de importação. A formulação com OCL

em parafina poderá ser uma alternativa econômica e eficiente, uma vez que o custo dos produtos para sua formulação é acessível e com durabilidade de, pelo menos, cinco semanas. Também podem ser realizados ajustes na fórmula da emulsão de parafina para permitir uma taxa de liberação mais lenta, ou rápida do OCL, de acordo com as condições climáticas onde a isca seria utilizada.

O antranilato de metila e benzaldeído desencadearam um comportamento de repelência em laboratório e campo. O estudo mais aprofundado sobre a ação quimiotática destas substâncias, principalmente a respeito das concentrações e formulações a serem utilizadas, pode resultar na obtenção de uma importante ferramenta para o manejo de abelhas em áreas urbanas e rurais nas quais a presença destes organismos é indesejada, como estabelecimentos comerciais e residenciais com grande circulação de pessoas ou em pomares de *Vitis vinifera* em época de colheita. Outra alternativa para utilização dos repelentes em agroecossistemas poderia ser através da incorporação destes em iscas tóxicas para controle de insetos praga, ou seja, as abelhas seriam repelidas e não entrariam em contato com o inseticida, preservando-se, desta forma, este importante polinizador. Importante ressaltar que para a utilização desses compostos em sistemas agrícolas é necessário diversos estudos sobre a interação desses no ambiente e com os diversos organismos presente no ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, A. et al. Different repellents for *Aedes aegypti* against blood-feeding and oviposition. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 1-8, 2014

ALDRICH. Aldrich Handbook - a **Catalog of Fine Chemicals and Laboratory Equipment**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/aldrich-chemistry/aldrich-handbook.html>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

ALLAN, S. A. et al. The influence of age and task specialization on the production and perception of honey bee pheromone. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 917-922, 1987.

ANFORA, G. et al. Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmiacornuta*) species of bee. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 206, n. 2, p. 236-239, 2010.

ATTERHOLT, C. A. et al. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 233–247, 1999

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas da Ciências Bio-médicas**. Belém: [s.n.], 2007. 339 p.

AZAMBUJA, W. **Benzaldeído ou aldeído benzóico**. Disponível em: <<http://www.oleos essenciais.org/benzaldeido-ou-aldeido-benzoico>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BARGMANN, C. I.; HARTWIEG, E.; HORVITZ, H. R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C.elegans*. **Cell**, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 515, 527, 1993.

BEEKMAN, M.; FATHKE, R. L.; SEELEY, T. D. How does an informed minority of scouts guide a honeybee swarm as it flies to its new home? **Animal Behaviour**, London, v. 71, n. 1, p. 161-171, 2006.

BETTERBEE. **Beekeepers serving beekeepers**. Disponível em: <<http://www.betterbee.com>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BOUCHER, M.; SCHNEIDER, S. S. Communication signals used in worker–drone interactions in the honeybee, *Apis mellifera*. **Animal Behaviour**, London, v. 78, n. 2, p. 247- 254, 2009.

CARVALHO, C. A. L.; BENTO, J. M. S.; MARCHINI, L. C. Feromônios de abelhas. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 10, p. 83-92.

CHUNG- CHENG, L. et al. The economics of honeybee swarming. **Regional Science and Urban Economics**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 581–594, 2003.

COLLINS, A. M. et al. Use of insect repellents for dispersing defending honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 3, p. 608-613, 1996.

COSSÉ, A. A.; BAKER, T. C. Electrophysiologically and behaviorally active volatiles of buffalo gourd root powder for corn rootworm beetles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 1, p. 51-66, 1999.

CRUZ–LANDIM C. **Biologia do desenvolvimento em abelhas**. Departamento de Biologia. Instituto de Biociências. Rio Claro: UNESP, 2004.

CURTIS, C. et al. Natural and synthetic repellents. In: CURTIS, C. F. (Ed.). **Appropriate Technology in Vector Control**. Florida: CRC Press, 1989. cap. 4.

DELAVIRA, R. L.; AGOSTINHO, A. A. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 2, p. 255-262, 1999.

ECKERT, C. D.; WINSTON, M. L.; YDENBERG, R. C. The relationship between population size, amount of brood and individual foraging behavior in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Oecologia**, Berlin, v. 97, n. 2, p. 248-255, 1994.

EISNER, T. et al. Defensive secretions of millipeds. In: BETTINI, S. (Ed.). **Arthropod Venoms**. Heidelberg: Springer, 1978. p. 41-72. v. 48.

ELTZ, T. et al. Determinants of stingless bee nest density in a lowland diptero carp forest of Sabah, Malaysia. **Oecologia**, Berlin, v. 131, n. 1, p. 27-34, 2005.

ESSLEN, J.; KAISLING, K. E. Number and distribution of the sensilla on the antennal flagellum of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Zoomorphologie**, Berlin, v. 83, p. 227-251, 1976.

FEWELL, J. H.; WINSTON, M. L. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Behaviour Ecology Sociobiology**, New York, v. 30, p. 387-393, 1992.

FONTA, C. et al. Cellular analysis of odour integration in the honeybee antennal lobe. In: GOODMAN, L. J.; FISHER, R. C. (Ed.). **Behaviour and Physiology of Bees**. Wallingford, UK: CAB International, 1991. p. 227-241.

FRASNELLI, E. et al. Morpho-functional asymmetric of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 209, n. 2, p. 221-225, 2010.

FREE, J. B. 1980. A organização social das abelhas *Apis*. Edusp: São Paulo, 13, 79p. Cap.10. In: **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. Ed.Vilela, E. F., Della Lucia, T. M. C. 2a. Edição. Ribeirão Preto: Holos, 2001.p. 83-92.

FREE, J. B. **Pheromones of social bees**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1987.

FREE, J. B. et al. Honeybee responses to chemical components from the worker sting apparatus mandibular glands in field tests. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 28 n. 1, p. 7-21, 1989.

GONÇALVES, L. S. A study of orientation information given by one trained bee by dancing. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 88, n. 3, p. 113-132, 1969.

GONÇALVES, L. S. A influência do comportamento das abelhas africanizadas na população, capacidade de defesa e resistência a doenças. In: **ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 1, 1994, Ribeirão Preto - SP. Anais... Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 1994, p. 69-79.

HARTER, W. R et al. Isca tóxica e disrupção sexual no controle da mosca-da-fruta-sul-americana e da mariposa-oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 45, n. 3, p. 229-235, 2010.

HEPBURN, H. R. Absconding, migration and swarming. In: HEPBURN, H. R.; RADCOFF, S. E. (Ed.). **Honeybees of Asia**. Berlin: Springer, 2011. p. 142-167.

HILDEBRAND, J.; SHEPHERD, G. Mechanisms of olfactory discrimination converging evidence for common principles across phyla. **Annual Review Neuroscience**, Palo Alto, v. 20, p. 595-631, 1997.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTADÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. p. 71. v. 40. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf>. Acesso em: 14 out. 2014.

ISCA. **Apresenta informações sobre produtos. ISCA**, Ijuí. Disponível em: <<http://www.isca.com.br/>>. Acesso em: 14 de mar. 2015.

KAIN, P. et al. Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. **Nature**, London, v. 502, p. 507- 514, 2013.

KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008.

KERR, W. E. The history of the introduction of africanized bees to Brazil. **South African Bee Journal**, Modderfontein, v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

KEVAN, P. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília: Ministry of Environment, Brazil, 2002. 312 p.

KNUDSEN, J. T. et al. Diversity and distribution of floral scent. **The botanical Review, Bronx**, v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.

LEAL, W. S. Pheromone reception. In: **Topics in Current Chemistry**. Berlin: Ed. Springer, 2005. p. 1-36. v. 240.

LEOPOLDINO, M. N. et al. Avaliação do feromônio sintético e óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) como atrativos para enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 12, n. 1, p. 19-23, 2002.

LINDAUER, M. Bienentanze in der Schwarmtraube. **Naturwissenschaften**. v. 38, n. 22, p. 509-513, 1951.

LINDAUER, M. Schwarmbienen auf Wohnungssuche. Zeitschrift für vergleichende **Physiologie**, Berlin, v. 37, n. 4, p. 263-324, 1955.

LOPER, G. M. et al. Radar detection of drones responding to honeybee queen pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 9, p. 1929-1938, 1993.

MARLEBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H. Efeitos de atrativos e repelentes sobre o comportamento da abelha (*Apis mellifera*, L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, 1998.

MARLEBO-SOUZA, D. T. et al. Métodos para atrair e repelir a abelha *Apis mellifera* L. em cultura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa flavicarpa*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2003.

MARLEBO-SOUZA, D. T. et al. Honeybee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L). Osbeck. var. Pera-Rio. **Journal of**

Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 144-153, 2004.

MASSON, C et al. Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. **Apidologie**, Versailles, v. 24, n.3, p. 169- 194, 1993.

MASSON, C.; ARNOLD, G. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. **Journal Insect Physiology**, London, v. 30, n. 1, p. 7-14, 1994.

MENZEL, R. Memory dynamics in the honeybee. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 185, n. 4, p. 323- 340, 1999.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees**. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press, 1974. 403 p.

MOORE, S. J. et al. Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector *Anopheles darlingi* in Riberalta, Bolivian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 624–630, 2007.

MOTA, M. H. V. B.; CRUZ–LANDIM, C. Ocorrência e morfometria de glândulas tegumentares abdominais em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 119-154, 1988.

MURAI, T. et al. Methyl anthranilate as an attractant for two thrips species and the thrips parasitoid *Ceranisus menes*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 11, p. 2557- 2565, 2000.

NUNES-SILVA, P. et al. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development Brazilian. **Journal Morphology Science**, São Paulo, v. 23, n. 3-4, p. 325-332, 2006.

PANKIW, T. Reducing honey bee defensive responses and social wasp colonization with methyl anthranilate. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 782, 788, 2009.

PANKIW, T.; PAGE JUNIOR, R. E. Brood pheromone modulates honeybee (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 49, p. 206-213, 2001.

PASTORI, P. L. et al. Avaliação da técnica de interrupção sexual utilizando emissores SPLAT® visando ao controle de *Bonagota salubricola* (Meyrick) e *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na pré-colheita de maçãs da cultivar 'Fuji'. **BioAssay**, Piracicaba, v. 3, p. 1-8, 2008.

PHAM-DELEGUE, M. H. et al. Effect of queen pheromone on worker bees of different ages: behavioural and electrophysiological responses. **Apidologie**, Versailles, v. 24, n. 3, p. 267-281, 1993.

PEREIRA, F. de M. et al. **Sistema de Produção de Mel**. Embrapa Meio-Norte. Jul/2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 3 set. 2014.

PETER, K. et al. **Química orgânica: estrutura e função**. 4. ed. Bookman: Porto Alegre, 2006.

PICKETT, J. A. et al. Nasanov pheromone of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Part I. Chemical characterization. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 6, n. 2, p. 425-436, 1980.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.

ROTHENBUHLER, W. C. et al. Bee Genetics. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v. 2, p. 413-438, 1968.

SACKIN, B. M.; FISHMAN, Y. **Mistura contendo benzaldeído e álcool**. US5738863 A, 14 abr. 1998. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US5738863>>. Acesso em: 20 out. 2014.

SANDOZ, et al. Understanding the logics of pheromone processing in the honeybee brain: from labeled-lines to across-fiber patterns. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Lausanne, v. 1, n. 1, 2007.

SCHMIDT, J. O. Attraction of reproductive honey bee swarms to artificial nest by Nasanov pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 5, p. 1053-1056, 1994.

SCHMIDT, J. O. Attraction or pheromone: the case of Nasanov secretion and honeybee swarms. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 9, p. 2051-2056, 1999.

SCHMIDT, J. O. Hierarchy of attractants for honey bee swarms. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 14, n. 4, p. 469- 477, 2001.

SCHMIDT, J. O. et al. Olfactory stimulation of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) attacks by insect repellents. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 275-278, 2003.

SEBRAE. **Oportunidades para o mercado de mel**. SEBRAE, 2014. (Resposta Técnica). Disponível em: <<http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20>

Pesquisas/2014_06_06_RT_Agroneg%C3%B3cio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2015.

SEELEY, T. D.; BUHRMAN, S. C. Nest-site selection in honey bees: how well do swarms implement the “best – of – N” decision rule? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 49, n. 5, p. 416-427, 2001.

SEELEY, T. D. et al. Group decision making in honey bee swarms. **American Scientist**, New Haven, v. 94, n. 3, p. 220- 229, 2006.

SESTA, G. et al. Methyl anthranilate in Citrus honey. Analytical method and suitability as a chemical marker. **Apidologie**, Versailles, v. 39, n. 3, p. 334-342, 2008.

SILVA, S. R. et al. Métodos para atrair a abelha *Apis mellifera* L. em cultura de abacate (*Persea americana* Mill). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 889-896, 2002.

SIMPSON, M. et al. Insect attraction to synthetic herbivore- induced plant volatile –treated field crops. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 13, n. 1, p. 45-57, 2011.

SLESSOR, K. N. et al. Semiochemicals of the honeybee queen mandibular glands. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n. 3, p. 851- 860, 1990.

THIÉRY, D.; MARION-POLL, F. Eletroantennogram responses of Douglas-fir seed chalcids to plant volatiles. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, n. 5-6, p. 483-490, 1998.

TOWNSEND, G. F. **Benzaldehyde: a new repellent for driving bees**. Bee World, Bucks, v. 44, p. 146- 149, 1963.

TRHLIN, M.; RAJCHARD, J. Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): a review. **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 56, n. 6, p. 256-273, 2011.

VETURIANO, R.; MONTEIRO, A. **Captura de enxames da espécie *Apis mellifera* no campus Urbanonova-UNIVAP**. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 6., 2006, Paraíba. Anais... Paraíba: [s.n.], 2006.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia**. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 9-12.

WEINSTOCK, G. M. et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, London, v. 443, p. 931-949, 2006.

WERNER, S. J.; PROVENZA, F. D. Reconciling sensory cues and varied consequences of avian repellents. **Physiology & Behavior**, New York, v. 102, n. 2, p. 158-163, 2011.

WILLIAMS, I. H. et al. Nasanov pheromone of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) IV: Comparative electroantennogram responses. **Journal of Chemical Ecology**, Nova York, v. 8, n. 2, p. 567-574, 1982.

WILSON, E. O. Chemical communication in the social insects. **Science**, Washington, v. 149, n. 3688, p. 1064-1071, 1965.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Cambridge, Massachussets: Harvard University Press,. 1987. 224 p.

WINSTON, M. L. The biology and management of africanized honey bees. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 173-193, 1992.

WINSTON, M. L.; SLESSOR, K. N. The essence of royalty: Honey bee queen pheromone. **American Science**, v. 80, p. 374–385, 1992.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Ed. Magister, 2003. . 276 p.

WOODROW, A. W. et al. Evaluation of chemical as honey bee attractants and repellentes. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 58, n. 6, p. 1094-1102, 1965.

WRIGHT, G. A. et al. A Honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration. **Behavioral Neuroscienc**, Washington, v. 123, n. 1, p. 36-43, 2009.