

## Bionomics and Behavior/Bionomia e Comportamento

# Respostas eletroantegráficas e comportamentais de abelhas africanizadas, *Apis mellifera* (Linnaeus), ao feromônio de Nasanov e ao óleo essencial de capim-limão

Patricia Daniela da Silva Pires<sup>✉</sup>, Josué Sant'Ana & Ricardo Bisotto-de-Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*EntomoBrasilis* 11 (2): 70-77 (2018)

**Resumo.** O objetivo do estudo foi avaliar as respostas eletrofisiológicas e comportamentais de abelhas africanizadas, *Apis mellifera* (Linnaeus), em duas idades, ao feromônio de Nasanov sintético (FNS) e ao óleo essencial de capim-limão (OCL), e verificar a porcentagem de ocupação de enxames em caixas de papelão com iscas de FNS comercial (**Swarm Catch Lure®**) ou OCL formulado em emulsão de parafina. Foram observadas as respostas eletroantegráficas (mV) e comportamentais de abelhas operárias nutrízes e campeiras (1-5 e 20-30 dias de idade, respectivamente) aos referidos compostos, em olfatômetro de dupla escolha. Os bioensaios de campo foram conduzidos em Eldorado do Sul e Minas do Leão (Brasil, RS), utilizando-se doze caixas com dois caixilhos contendo uma tira de cera alveolada cada e iscadas com OCL ou FNS ou sem tais tratamentos (controle). Não foram observadas diferenças nas respostas eletrofisiológicas e comportamentais entre operárias jovens e velhas submetidas aos voláteis de FNS e OCL. O limiar de resposta para o feromônio foi de 0,1 mg/mL e para o óleo, 10 mg/mL. O feromônio de Nasanov e o óleo de capim-limão desencadearam resposta quimiotática positiva nas abelhas. Caixas com FNS atraíram mais enxames que as com OCL e controle.

**Palavras-chave:** Comportamento; comunicação química; enxame; olfatômetro; eletroantegráfia.

### Electroantennographic and behavioral responses of Africanized bees, *Apis mellifera* (Linnaeus), to nasanov pheromone and lemongrass essential oil

**Abstract.** The study aimed to evaluate and compare the electrophysiological and behavioral responses of africanized honey bees (workers), *Apis mellifera* (Linnaeus) at different ages, to synthetic Nasanov pheromone (SNP) and to lemongrass essential oil (LGO), as well as, to verify occupancy percentage of swarms in baited cardboard boxes with SNP commercial (Swarm Catch Lure®) or LGO formulated in paraffin emulsion. Tests were conducted to observe electroantennographic responses (mV) and chemotactic behavior of nurse and forage workers bees (1-5 and 20-30 days old, respectively), to those compounds, in two choice olfactometer. The field bioassay was conducted by using twelve cardboard boxes with two bee wax sheet foundation placed in each frame, baited with SNP or LGO or without these treatments (control), in Eldorado do Sul and Minas do Leão (Brazil, RS). The mean number of swarms found in all treatments, were checked weekly. It was not observed electrophysiological and behavioral difference responses between young and old workers subjected to SNP and LGO odors. The threshold to Nasanov synthetic pheromone was 0.1 µg/µL and to lemongrass essential oil, 10 µg/µL. Synthetic Nasanov pheromone and lemon grass oil triggered positive chemotaxis in bees. Cardboard boxes with commercial SNP were more attractive to swarms than those baited with LGO and control treatment.

**Keywords:** Behavior; chemical communication; swarm; olfactometer; electroantennographic.

Abelha africanizada é originária de um cruzamento natural entre *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (abelha africana) e *Apis mellifera ligustica* Spinola (abelha européia) (MICHENER 1975). Abelhas oriundas desta mistura de raças são conhecidas por suas características defensivas e seu maior potencial enxameatório em relação às raças europeias (MICHENER 1975), o qual está relacionado ao comportamento reprodutivo e permite a dispersão de enxames no ambiente (HEPBURN & RADLOFF 2011). Durante o processo de enxameação as abelhas batedoras fazem uma varredura à procura de possíveis locais para a nidificação e, posteriormente, sinalizam

para as irmãs e para a rainha a localização do sítio adequado (WRAY & SEELEY 2011). Abelhas operárias podem ser observadas na entrada de colmeias com o abdômen levantado agitando as asas e expondo a glândula feromonal (LINDAUER 1951). Através desse comportamento, elas liberam o feromônio de Nasanov que sinaliza a localização do ninho para 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). De acordo

#### Edited by:

William Costa Rodrigues

#### Article History:

Received: 23.ii.2018

Accepted: 25.iv.2018

#### ✉ Corresponding author:

Patricia Daniela da Silva Pires

✉ [patidpires@gmail.com](mailto:patidpires@gmail.com)

🌐 <http://orcid.org/0000-0003-4831-591X>

#### Funding agencies:

↗ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

WINSTON (1987) o feromônio de Nasanov também pode atuar na sinalização para fontes de alimento.

De forma semelhante, alguns óleos essenciais podem intermediar a comunicação química de abelhas, desencadeando comportamentos de repelência ou mesmo atratividade, principalmente quando estes são análogos aos encontrados nos feromônios por elas produzidos (MARLEBO-SOUZA & NOGUEIRO-COUTO 1998). Óleos presentes em plantas do gênero *Cymbopogon* são tradicionalmente utilizados como repelentes para mosquitos (principalmente a citronela, *Cymbopogon nardus* Linnaeus (MOORE et al. 2007). Por outro lado, já foi observada a atratividade de *Apis mellifera* ao óleo de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.] (LEOPOLDINO et al. 2002; MALERBO-SOUZA et al. 2004), provavelmente por esse conter substâncias como o citral e o geraniol, ambos encontradas no feromônio de Nasanov.

A utilização de substâncias atrativas e com baixo custo pode ser uma importante ferramenta para o manejo de enxames de abelhas africanizadas em áreas urbanas e rurais, tendo em vista que quando estão alojados em locais inapropriados podem causar acidentes envolvendo pessoas e animais domésticos. Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar as respostas eletrofisiológicas e comportamentais de *A. mellifera*, de diferentes idades, ao feromônio de Nasanov sintético e ao óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) em laboratório, bem como, verificar o percentual de ocupação de enxames em caixas iscas contendo estas substâncias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas operárias (*A. mellifera*) foram isoladas, de diferentes colmeias, mantidas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (30°01' S; 51°13' W), Brasil, a partir de favos de cria operculados. Estes permaneceram em câmara climatizada (30 ± 1 °C, 60 ± 10% UR) até a emergência das abelhas. Para controle da idade, os insetos eram marcados no tórax com tinta atóxica (caneta UniPOSCA®) logo após a emergência, sendo as operárias posteriormente liberadas na colmeia de origem, onde permaneciam até a realização dos bioensaios. Os testes foram realizados com abelhas de 1-5 (nutrizes) e/ou 20-30 dias de idade (campeiras). Com uma hora de antecedência à realização dos bioensaios, as colmeias eram manejadas com fumigador e as operárias que haviam sido marcadas anteriormente eram então capturadas e transferidas, com o auxílio de um aspirador de pó modificado (Makita, mod. C1100 Dw), para copos plásticos (200 mL) com água destilada, ofertada em buchas de algodão através de um orifício na tampa.

**Eletroantenografia (EAG).** As abelhas foram imobilizadas e observadas em estereomicroscópio (aumento de 400X), onde foi 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), sendo as respostas (mV) registradas pelo software EAG2000 (Syntech®).

Para o teste de sensibilidade (dose-resposta) foram utilizadas antenas de abelhas campeiras (20-30 dias de idade), submetidas aos odores do feromônio de Nasanov sintético (FNS) (0,5 mL/Eppendorf®) (**Swarm Catch Lure**, Contech Inc.- SCL) e do óleo essencial de capim-limão (OCL) (*C. citratus*) (Tekpon®) em cinco concentrações, de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>2</sup>µg/µL, diluído em etanol PA (Sigma-Aldrich), bem como, às substâncias puras.

Posteriormente foram avaliadas as respostas de antenas de abelhas entre 1-5 dias de idade (nutrizes) e/ou 20-30 dias (campeiras) ao etanol (controle) e ao FNS e OCL, em uma única concentração (10 µg/µL). Nestes bioensaios todos os tratamentos foram pipetados (10 µL) separadamente em papel filtro (1,5 x 2,5 cm) (Whatman, 4 x 15 cm/80 g/m<sup>2</sup>). A ordem de exposição dos estímulos às antenas foi aleatória, com exceção do

controle (etanol), que era utilizado sempre no início e ao final do bioensaio.

Também foram avaliadas as respostas das antenas de abelhas campeiras a emulsões de parafina contendo OCL confeccionadas pela empresa TECNANO - Nanotecnologia para a Agricultura, Porto Alegre, RS. Um grama das emulsões com 10% de óleo essencial de capim-limão (EOCL) ou como o produto inerte (controle), foi pesado em balança de precisão e colocado, com o auxílio de uma seringa, sobre um papel sulfite de 3 cm<sup>2</sup>. Um conjunto com 24 amostras similares e isoladas de cada um destes tratamentos foi inserido no interior de três caixas de papelão, com volume de 35 L, contendo dois caixilhos de madeira com uma tira de cera alveolada (5 x 42 cm) fixada na barra superior de cada caixilho e mantidas em condições de campo (20 ± 5 °C, 70 ± 10% UR). A cada sete dias eram retiradas três amostras de cada tratamento, ao longo de oito semanas de exposição, e estas armazenadas em temperatura de -4 °C até a realização dos testes. Assim como as emulsões, a formulação comercial do feromônio (SCL) também foi avaliada, seguindo o mesmo protocolo de exposição e armazenamento já descrito, sendo este considerado o controle positivo do bioensaio.

Uma mesma antena era estimulada por EOCL, SCL e controle, expostos pelo mesmo período no ambiente. Estes tratamentos eram colocados dentro de tubos adaptados tipo Falcon (50 mL). Para todas as antenas testadas, sempre o primeiro e o último estímulo foram com a emulsão inerte (controle) e os outros dois submetidos aleatoriamente. Foram realizadas 18 repetições por tratamento em todos os testes eletroantenográficos.

**Olfatometria.** Foram avaliadas as respostas quimiotáticas de operárias de *A. mellifera* jovens (5-15 dias de idade) e/ou velhas (20-30 dias de idade) ao OCL e FNS em olfátometro de dupla escolha, tipo Y. Os testes foram conduzidos em sala com condições controladas (25 ± 1 °C e 70 ± 10% RH) e na presença de luz (900 lumens), entre às 9-14 h. Com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 10 µL de cada tratamento em papel filtro (1,5 x 2,5 cm) contendo as substâncias isoladas em diferentes concentrações: 0,1 µg/µL para o FNS e 0,1 e 10 µg/µL para o OCL, ambas diluídas em etanol. Estas concentrações foram definidas através do teste de sensibilidade (EAG).

Somente o comportamento de abelhas campeiras foi observado frente ao EOCL (10%), à emulsão inerte (testemunha), SCL e o controle deste último (tubo tipo Eppendorf vazio). Todos os tratamentos ficaram expostos por até oito semanas no campo, sendo posteriormente recolhidos e armazenados em temperatura de -4 °C até a realização dos testes.

A arena do olfátometro de duas escolhas do tipo "Y" foi confeccionada com tubos de vidro transparente de 2 cm de diâmetro interno, arena inicial com 10 cm bifurcada em dois braços 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 0,3-0,4 L/min. Cada operária de *A. mellifera* era liberada na arena sendo as respostas consideradas positivas quando as abelhas alcançavam a fonte de odor ou percorriam, pelo menos, 4 cm dentro de um dos braços, permanecendo nessa área por, no mínimo, um minuto. Os testes foram conduzidos por 10 minutos e foram feitas 40 repetições por tratamento, contrastando os odores com os respectivos controles. Os insetos que não se locomoveram em direção aos tratamentos foram considerados não responsivos e não foram considerados na análise estatística. Cada abelha foi testada apenas uma vez.

**Bioensaio de campo.** 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), entre outubro/2013 e maio/2014 e na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS,

localizada em Eldorado do Sul, RS (30°05'52" S, 51°39'08" W) entre janeiro e maio de 2014. A área experimental de Minas do Leão possui cerca de 2 ha, com cobertura de campo nativo e cultivo de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) no entorno. A área de Eldorado do Sul possui 1,6 ha com campos de pastagens naturais, áreas de eucalipto, além de culturas anuais como soja [*Glycine max* (L.) Merr.] e milho (*Zea mays* L.), no entorno. Em ambos os locais havia a presença de apiários que se encontravam a uma distância aproximada de 150 m das áreas experimentais. A temperatura e pluviosidade médias durante a realização dos bioensaios foram de 25,5 °C e 5 mm, respectivamente.

Foram utilizadas caixas isca com volume de 35 L, confeccionadas com papelão ondulado, branco na parte externa e com tampa metalizada, seguindo as medidas dos núcleos padrão Langstroth com capacidade para cinco quadros de ninho (caixilhos). No interior de cada uma das caixas eram colocados apenas dois caixilhos, centralizados, contendo uma tira de cera alveolada (42 cm x 5 cm) fixadas na barra superior do mesmo. Todas as caixas isca foram cobertas e protegidas da chuva por sacos plásticos transparente deixando-se apenas uma abertura (2,5 cm x 5 cm) para entrada e saída de abelhas.

As caixas foram posicionadas no chão distantes 5 m entre si e iscadas com um dos seguintes tratamentos: SCL [0,5 mL de FNS em Eppendorf, óleo essencial de capim-limão formulado em emulsão de parafina (10%) (EOCL) (1 g) e somente emulsão de parafina (controle)]. Os tratamentos foram colocados na parte de baixo 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 enxames alojados, as caixas eram fechadas e removidas do local, sendo uma nova, com o respectivo tratamento, instalada em outra posição, dentro da mesma subparcela.

**Análise estatística.** As respostas eletroantenográficas (mV) foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Dunn. Nos experimentos comportamentais, os dados foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o número médio de enxames de abelhas coletados em caixas Langstroth foi comparado pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas pelo programa Bioestat 5.3® software (AYRES 2005), com nível de confiabilidade de 95%.

## RESULTADOS

**Eletroantenografia.** O limiar de resposta (sensibilidade) para o FNS foi atingido em concentrações de aproximadamente 0,1 µg /µL (Dunn,  $P < 0,0001$ ) (Figura 1), ou seja, menores do que para o OCL (~10 µg/µL) (Figura 2) (Dunn,  $P < 0,0001$ ). Concentrações abaixo dos referidos valores, foram similares ao controle (etanol) (Dunn,  $P > 0,05$ ).

As respostas eletrofisiológicas de *A. mellifera* para cada composto (seletividade) não foram diferente entre abelhas jovens e velhas (Dunn,  $P > 0,05$ ). Antenas de abelhas desencadearam respostas maiores a FNS e ao tratamento OCL em relação ao controle (Dunn,  $P < 0,01$ ), mas não houve diferença de respostas entre os grupos de idade (Tabela 1). Assim como constatado nos bioensaios com as substâncias testadas em papel filtro, foi observado que, em geral, as respostas eletrofisiológicas de antenas de *A. mellifera* submetidas ao EOCL e SCL, não diferenciaram entre si, mas foram maiores em comparação com o tratamento controle (emulsão inerte) (Dunn,  $P < 0,01$ ). Também não foi constatado, um decréscimo no tamanho das respostas eletroantenográficas em função do tempo de exposição dos diferentes tratamentos ao longo das oito semanas (Dunn,  $P > 0,05$ ) (Tabela 2).

**Bioensaios comportamentais.** Operárias novas ( $\chi^2 = 9, 8; gl = 1; P = 0,0017$ ) e velhas ( $\chi^2 = 12,8; gl = 1; P = 0,0003$ ) de *A. mellifera* africanizadas foram significativamente mais atraídas para o FNS na concentração de 0,1 µg/µL quando comparado ao controle (etanol) (Figura 3), não havendo diferenças de respostas

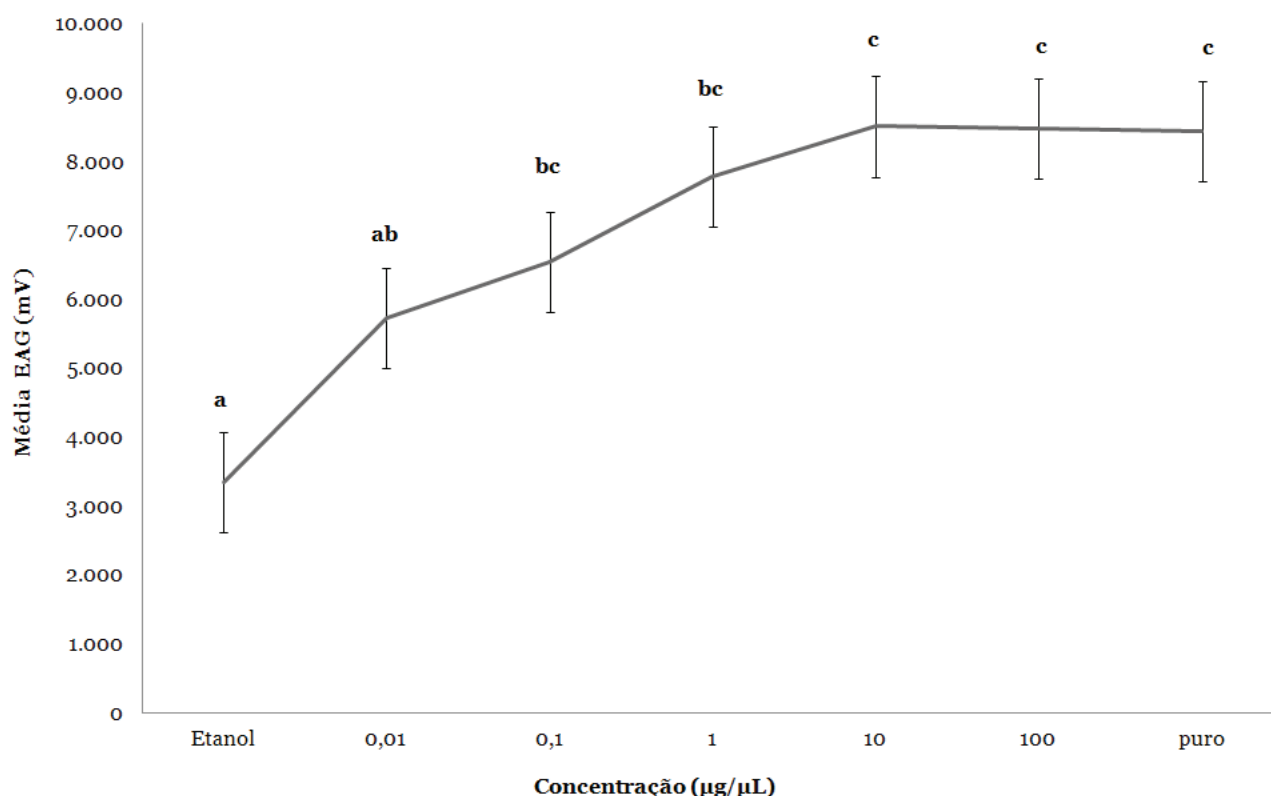


Figura 1. Respostas eletroantenográficas (mV) ( $\pm$  EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações do feromônio de Nasanov sintético (FNS): 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/µL e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Dunn,  $P < 0,05$ ) ( $n = 18$ ).

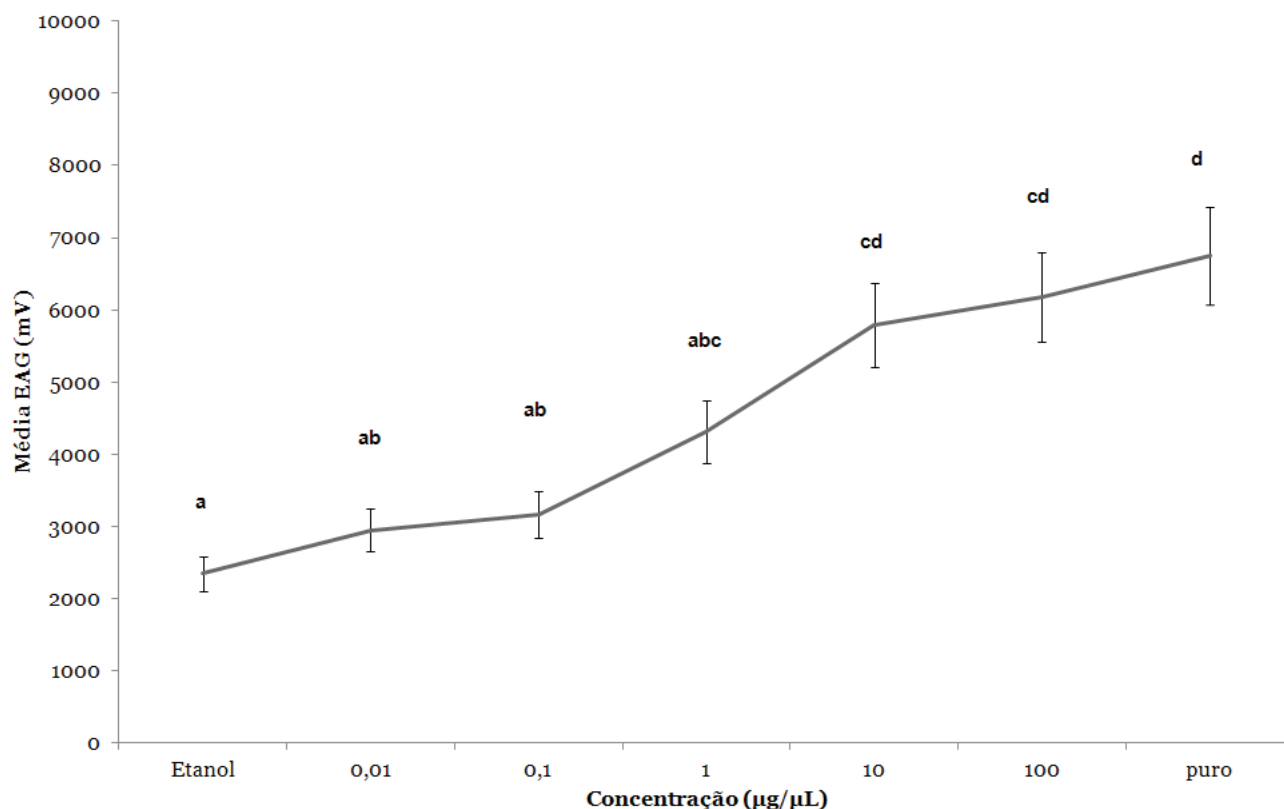


Figure 2. Respostas eletroantegráficas (mV) ( $\pm$  EP) de *Apis mellifera* campeiras às seis concentrações do óleo essencial de capim-limão (OCL): 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/µL e puro e ao solvente etanol (controle). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si (Dunn,  $P < 0,05$ ) ( $n = 18$ ).

Tabela 1. Média de respostas eletroantegráficas (mV) ( $\pm$  EP) 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) e etanol (controle) ( $n = 18$ ).

Tratamento	Idade das operárias (dias/resposta (mV $\pm$ SEM))	
	1-5	20-30
OCL	12,1 $\pm$ 1,21 Aa*	11,3 $\pm$ 0,83 Aa
FNS	11,1 $\pm$ 1,32Aa	10,4 $\pm$ 0,84 Aa
Etanol (controle)	6,1 $\pm$ 0,56 Ba	4,1 $\pm$ 0,51 Ba

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

Tabela 2. Respostas eletroantegráficas (milivolts - mV) ( $\pm$  EP) de *Apis mellifera* (20-30 dias de idade), aos compostos sintéticos: formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (SCL) (Swarm Catch Lure Inc.), emulsão com óleo essencial de capim-limão (EOCL) e a emulsão de parafina (controle), expostos por até oito semanas em condições de campo ( $20 \pm 5$  °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
SCL	8,9 $\pm$ 1,41 Aab	9,1 $\pm$ 0,76 Aab	12,1 $\pm$ 1,11 Aa	10,2 $\pm$ 1,12 Aab	8,4 $\pm$ 0,56 Aab	7,2 $\pm$ 0,97 Aab	6,5 $\pm$ 0,75 Ab	6,62 $\pm$ 0,56 Ab
EOCL	6,0 $\pm$ 0,87 Ab	5,9 $\pm$ 0,47 ABb	8,5 $\pm$ 1,01 Ba	8,4 $\pm$ 1,19 Aa	8,6 $\pm$ 0,76 Aa	6,3 $\pm$ 0,85 Aab	6,1 $\pm$ 0,53 Aab	4,91 $\pm$ 0,40 Ab
Controle	1,5 $\pm$ 0,26 Bb	3,7 $\pm$ 0,26 Cab	5,6 $\pm$ 0,54 Ca	4,2 $\pm$ 0,34 Ba	3,4 $\pm$ 0,24 Ba	2,0 $\pm$ 0,25 Bab	2,4 $\pm$ 0,20 Bab	2,36 $\pm$ 0,21 Bab

\*Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Dunn ( $P < 0,05$ ).

entre abelhas de idades diferentes ao FNS ( $\chi^2 = 0,036$ ; gl = 1;  $P = 0,8488$ ).

Resultado semelhante foi observado para o OCL, onde aproximadamente 60% das abelhas campeiras se direcionaram ao tratamento contendo o capim-limão (0,1 µg/µL), em relação aos 32 % que foram para o controle ( $\chi^2 = 7,2$ ; gl = 1;  $P = 0,0073$ ), o mesmo foi observado com abelhas nutrizas ( $\chi^2 = 7,2$ ; gl = 1;  $P = 0,0073$ ) (Figura 4). Operárias, de ambas as idades, submetidas ao tratamento na concentração de 10 µg/µL foram significativamente mais responsivas ao etanol ( $\chi^2 = 5$ ; gl = 1;  $P = 0,0253$ ).

Quando foi contrastado o comportamento quimiotáxico de campeiras frente ao OCL e ao FNS, simultaneamente, ambos na concentração de 0,1 µg/µL, registraram-se um número

semelhante de abelhas em cada um deles ( $\chi^2 = 0,200$ ; gl = 1;  $P = 0,6547$ ).

As abelhas foram mais atraídas para ao SCL, em relação ao controle, independentemente do tempo de exposição da formulação ( $P < 0,05$ ). Em relação ao EOCL, foi verificada a atratividade para campeiras até a quinta semana de exposição ( $\chi^2 = 7,2$ ; gl = 1;  $P = 0,0073$ ), a partir da sexta, o percentual de escolhas das abelhas não diferiu significativamente do controle.

**Bioensaio de campo.** O número total de enxames de *A. mellifera* africanizadas capturados, nas caixas isca contendo o SCL (Swarm Catch Lure Contech Inc.), nos dois municípios, foi significativamente maior do que nas caixas iscadas com os demais tratamentos (ANOVA;  $P < 0,05$ ) (Tabela 3).



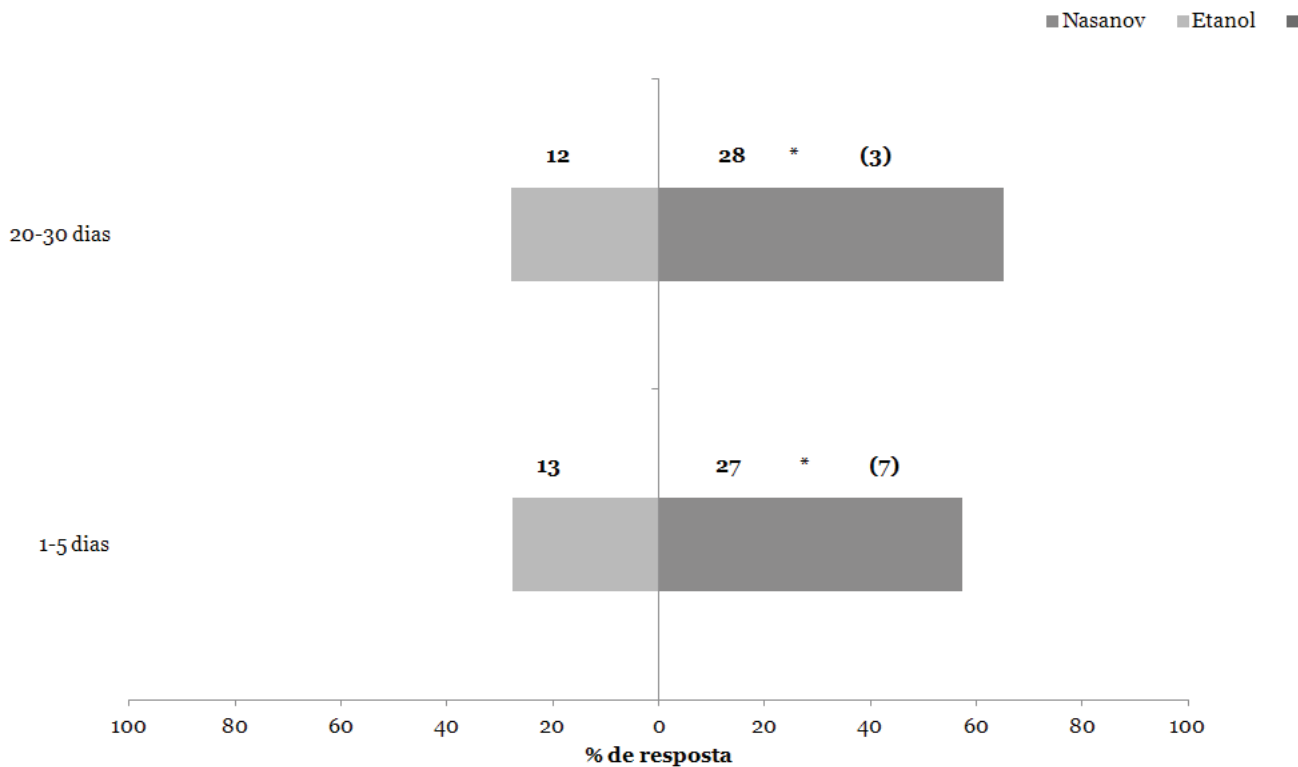


Figura 3. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade, em olfatômetro de dupla escolha, submetidas ao feromônio de Nasanov sintético (FNS) (0,1µg/µL) e etanol (controle), em papel filtro. \*O número de abelhas que se direcionaram ao feromônio de Nasanov difere significativamente do controle ( $\chi^2$ ;  $P < 0.05$ ). Números entre parênteses indica a quantidade de insetos não responsivos.

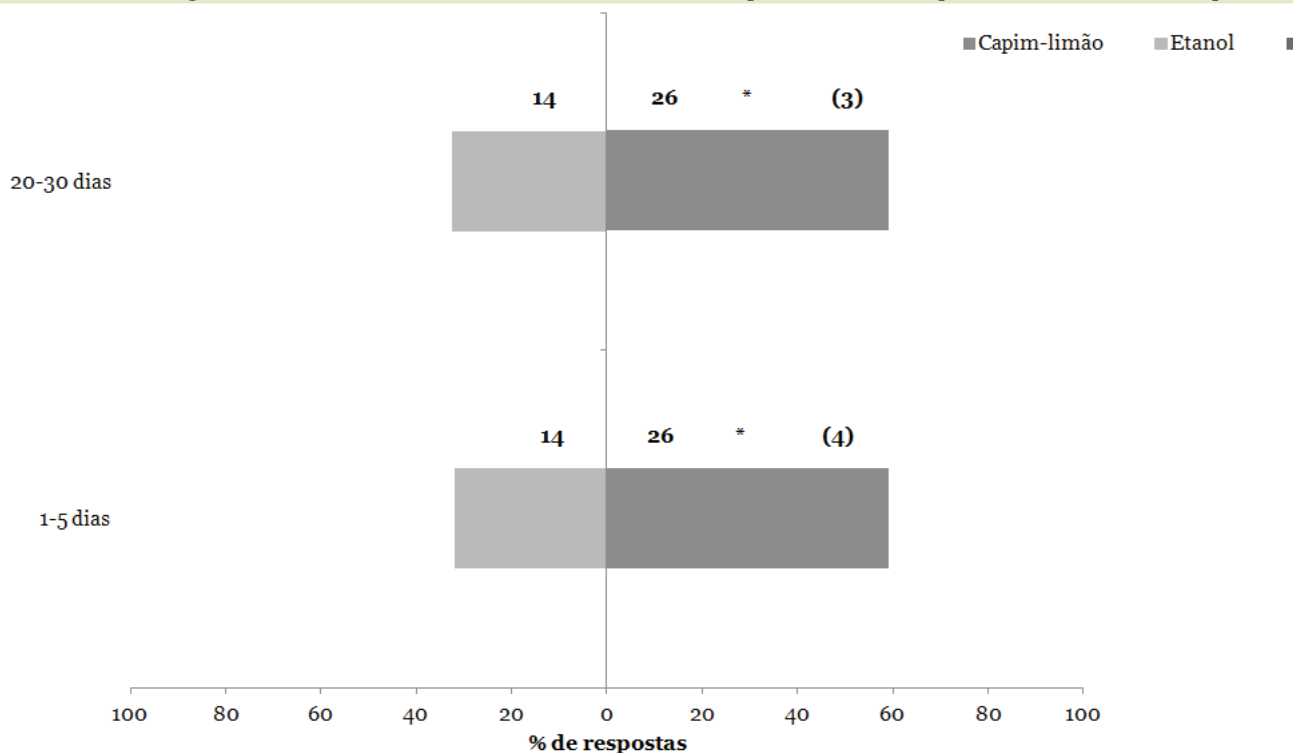


Figure 4. Respostas quimiotáticas de operárias (%) de *Apis mellifera* com 1-5 e 20-30 dias de idade, em olfatômetro de dupla escolha, submetidas ao óleo essencial de capim-limão (OCL) (0,1 µg/µL) e etanol (controle) em papel filtro. \*O número de abelhas que se direcionaram ao OCL difere significativamente do controle ( $\chi^2$ ;  $P < 0.05$ ). Números entre parênteses indica a quantidade de insetos não responsivos.

Tabela 3. Número médio ( $\pm$  EP) de enxames de *Apis mellifera* coletados em caixas isca com formulação comercial do feromônio de Nasanov sintético (SCL) (Swarm Catch Lure), emulsão de parafina sem (controle) e com óleo essencial de capim-limão (EOCL), 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
SCL	2,0 $\pm$ 0,24 a	4,0 $\pm$ 0,40 a	6,0 $\pm$ 0,53 a*
EOCL	0,5 $\pm$ 0,04 ab	1,5 $\pm$ 0,05 ab	2,0 $\pm$ 0,24 b
Controle	0 b	1,0 $\pm$ 0,14 b	1,0 $\pm$ 0,28 b

\*Médias seguidas por letras diferentes nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Nesse trabalho constatou-se que tanto em bioensaios eletroantegráficos como nos de olfatométrica, *A. mellifera* foi significativamente mais atraída para o feromônio de Nasanov sintético e ao óleo essencial de capim-limão em relação ao controle, não havendo diferenças entre estes tratamentos quando comparados entre si, assim como entre as operárias nutrízes e campeiras. Esta similaridade entre as respostas pode estar relacionada ao fato de ambos os tratamentos compartilharem substâncias em comum, que, quando volatizadas, já seriam suficientes para desencadear os potenciais de ação de mesma intensidade nas sensilas antenais. Segundo THIÉRY & MARION-POLL (1998) os níveis de despolarizações nas antenas dependem da importância do composto na rotina dos insetos. O feromônio de Nasanov é responsável pela orientação, aglomeração e forrageamento, auxiliando as abelhas a encontrarem sítios de alimentação e de nidificação (HEPBURN & RADLOFF 2011). Do mesmo modo, o óleo essencial de capim-limão, por ter substâncias análogas ao FNS, como o citral e o geraniol, também podem desencadear comportamentos semelhantes em operárias, independentemente da idade destas (MALERBO-SOUZA *et al.* 2003).

Apesar das antenas apresentarem respostas similares quando estimuladas com estes dois odores, a dose-resposta para o FNS foi menor quando comparada ao OCL. Este menor limiar de resposta ao feromônio sintético pode estar associado à maior complexidade de substâncias envolvidas na comunicação química de abelhas presentes neste odor, em relação ao capim-limão, o qual não contém, por exemplo, um dos compostos do feromônio, o ácido nerólico (PICKETT *et al.* 1980). De acordo com RENOU (2014), o tipo (quantidade e qualidade) de estímulo é muito importante na comunicação química de insetos, sendo que quanto maior for à interação entre os componentes de uma mistura e os códigos neurais destes, mais sensível será o organismo a este odor, ou seja, uma menor quantidade de feromônio já seria suficiente para ativar os neurônios presentes nas sensilas olfativas, podendo resultar em uma resposta motora rápida com uma concentração menor de estímulo.

Por outro lado, o aumento da concentração de uma substância pode provocar a saturação das proteínas receptoras das antenas dos insetos interferindo na interpretação neurofisiológica em relação ao estímulo olfativo exposto, fazendo com que este odor deixe de ser atrativo (WRIGHT *et al.* 2009), o que explicaria o fato da ausência de resposta quimiotáxia positiva de abelhas ao OCL na concentração de 10 µg/µL.

As antenas de operárias jovens e velhas responderam de forma similar tanto ao FNS como ao OCL. Resultado semelhante foi constatado por ALLAN *et al.* (1987), ou seja, os autores não observaram um acréscimo no tamanho das respostas eletrofisiológicas de operárias de *A. mellifera ligustica* (idades entre 1 a 60 dias) quando as antenas foram estimuladas com os compostos feromonais presentes nas glândulas mandibulares de rainhas ou com o feromônio de alarme. MASSON & ARNOLD (1984) já haviam constatado em bioensaios eletroantegráficos que a despolarização das sensilas olfativas de operárias de *A. mellifera* (raça europeia) atingiu seu máximo no 4º dia, permanecendo inalterada até os 22. Resultados semelhantes foram registrados por PHAM-DELÉGUE *et al.* (1993) os quais também não observaram diferença significativa na quimiotaxia de operárias de diferentes idades quando submetidas ao feromônio natural e sintético da rainha de *A. mellifera*. Estes resultados corroboram com o relatado por MASSON *et al.* (1993) os quais comentaram que a similaridade de respostas de abelhas jovens e velhas a determinados compostos é maior quando estes insetos são expostos a estas substâncias desde as fases imaturas. Segundo AL-KAHTANI & BIENEFELD (2012) o feromônio de Nasanov é utilizado dentro da colmeia como marcador, orientando as abelhas nutrízes a encontrar e alimentar

com geleia real as larvas, justificando, desta forma, o comentário feito por MASSON *et al.* (1993).

Assim como constatado nos bioensaios com as substâncias aplicadas e testadas em papel filtro, foi observado que o EOCL e SCL também desencadearam maiores respostas eletroantegráficas em campeiras, independentemente do tempo de exposição. Esse resultado pode ser decorrente das interações químicas entre as matrizes dispersoras e os ingredientes ativos (compostos) com taxas de liberação similares e suficientes para ativar os mecanismos de percepção neurofisiológicos presentes nas antenas de *A. mellifera*. No entanto, constatou-se que ao contrário da SCL, a EOCL se manteve atraente em testes quimiotáxicos por um período menor. Segundo MASSON *et al.* (1993) as abelhas podem apresentar respostas eletroantegráficas 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. Desta forma, é possível supor que a qualidade ou quantidade dos voláteis liberados pelo tratamento EOCL, após seis semanas de exposição, não foram adequados para promover o deslocamento das operárias em olfatômetro.

O número de enxames de *A. mellifera* africanizadas capturados nas caixas isca contendo SCL foi significativamente maior do que nas caixas iscadas com EOCL. Neste estudo foi utilizada uma isca comercial utilizada para a captura de enxames de abelhas de raças europeias. Sendo assim, este resultado é importante, visto que até o presente momento não se tinha registro científico da atividade de abelhas africanizadas a esta formulação.

Diferenças de respostas comportamentais de *A. mellifera* frente ao óleo de capim-limão e a componentes presentes no feromônio de Nasanov já haviam sido constatadas por MALERBO-SOUZA *et al.* (2004) em condições de campo. Segundo os autores, a pulverização deste óleo essencial em pomares de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], aumentou o número de visitas de campeiras de raças europeias 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.

De forma semelhante, 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 (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 SCL, em detrimento aos com EOCL.

Outro fator que deve ser levado em consideração em relação às capturas está relacionado ao tipo de formulação. Nesse trabalho se utilizou uma emulsão de parafina como matriz dispersora do óleo de capim limão, a qual pode ter diminuído ou aumentado a taxa de liberação dos voláteis, interferindo na atratividade de abelhas ao EOCL. Apesar de este extrato ter compostos semelhantes aos do feromônio de Nasanov (PICKETT 1980), este se diferenciou da isca comercial, possivelmente pela competitividade com os demais voláteis presentes nesta, como já discutido anteriormente.

A formulação em base de parafina foi escolhida por já ser utilizada comercialmente no controle e manejo de outros insetos, principalmente em técnicas de interrupção do acasalamento em lepidópteros, na qual um dos requisitos é a obtenção de uma formulação com uma taxa de liberação constante ao longo do tempo (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) (Lepidoptera, Tortricidae) (ISCA 2016). Essa mesma tecnologia está sendo utilizada em outro atrativo para *A. mellifera* (ApisBloom) visando o aumento de visitas de campeiras durante o período de floração de diversas culturas (ISCA 2016).

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 SCL ter capturado mais enxames do que o EOCL 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, com a ausência do SCL, potencialize a atratividade de abelhas para caixas isca com o óleo, pois a presença deste não seria camuflada pelo 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 por 0,5 mL de ingrediente ativo (BETTERBEE 2016), além das taxas de importação. A formulação com EOCL pode 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. Ajustes na fórmula da emulsão de parafina também devem ser realizados para permitir uma maior atratividade e controle nas taxas de liberação.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

## REFERÊNCIAS

- Al-Kahtani, S.N. & K. Bienefeld, 2012. The Nasanov gland pheromone is involved in recruiting honeybee workers for individual larvae to be reared as queens. *Journal Insect Behavior*, 25: 392-400. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10905-011-9307-3>.
- Allan, S.A., K.N. Slessor, M.L. Winston & G.G.S. King, 1987. The influence of age and task specialization on the production and perception of honey bee pheromones. *Journal Insect Physiology*, 33: 917-922, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90003-5).
- Anfora, G., E. Frasnelli, B. Maccagnani, L.J. Rogers & G. Vallortigara, 2010. Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmia cornuta*) species of bee. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, 206: 236-239, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.023>.
- Atterholt, C.A., M.J. Delwiche, R.E. Rice & J.M. Krochta, 1999. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release* 57: 233-247. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00119-9).
- Ayres, M., M. Ayres Junior, D.L. Ayres & A.S. Santos, 2005. BioEstat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas da Ciências Bio-médicas. Belém: [s.n.], 339 p.
- Betterbee, 2016. Beekeepers serving beekeepers. Disponível em: <http://www.betterbee.com>. [Acesso em: 22.ii.2018].
- Harter, W.R., A.D. Grutzmacher, D.E. Nava, R.S. Gonçalves & M. Botton, 2010. Isca tóxica e interrupção sexual no controle da mosca-da-fruta-sul-americana e da mariposa-oriental em pessegueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 229-235. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000300001>.
- Hepburn, R. & S.E. Radloff, 2011. *Honeybees of Asia*. Berlin, Springer, 669 p.
- ISCA, 2016. Apresenta informações sobre produtos. ISCA, Ijuí. Disponível em: <http://www.isca.com.br>. [Acesso em: 22.ii.2018].
- Leopoldino, M. N., B.M. Freitas, R.M. Sousa & F.D.G. Paulino, 2002. Avaliação do feromônio sintético e óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) como atrativos para enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). *Ciência Animal*, 12: 19-23. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo2.2002.1.pdf>.
- Lindauer, M., 1951. Bienenanze in der Schwarmtraube. *Naturwissenschaften*, 38: 509-513.
- Marlebo-Souza, D. T. & R.H. Nogueira-Couto, 1998. Efeitos de atrativos e repelentes sobre o comportamento da abelha (*Apis mellifera*, L.). *Scientia Agricola*, 55: 388-394. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161998000300006>.
- Marlebo-Souza, D.T., A. Charlier, M.M. Rossi, A.S. Pinto & R.H. Nogueira-Couto, 2003. Métodos para atrair e repelir a abelha *Apis mellifera* L. em cultura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa flavicarpa*). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 25: 1-8. DOI: <http://10.4025/actascianimsci.v25i1.2036>.
- Marlebo-Souza, D.T., R.H. Nogueira-Couto & L.A. Couto, 2004. Honeybee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L). Osbeck. var. Pera-Rio. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 10: 144-153. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992004000200004>.
- Masson, C. & G. Arnold, 1984. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. *Journal Insect Physiology*, 30: 7-14. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(84\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(84)90104-5).
- Masson, C., M.H. Pham-Delegue, C. Fonta, J. Gascuel, G. Arnold, G. Nicolas & M. Kerszberg, 1993. Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 24: 169-194, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19930302>.
- Michener, C.D, 1975. The Brazilian bee problem. *Annual Review Entomologic*, 20: 399-416. DOI: <http://10.1146/annurev.en.20.010175.002151>.
- Moore, S.J., N. Hill, C. Ruiz & M.M. Cameron, 2007. 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*, 44: 624-630. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.4.624>.
- Pham-Delegue, M.H., J. Trouiller, C.M. Caillaud, B. Roger & C. Masson, 1993. Effect of queen pheromone on worker bees of different ages: behavioural and electrophysiological responses. *Apidologie*, 24: 267-281. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19930307>.
- Pickett, J.A., I.H. Willians, A.P. Martin & M.C. Smith, 1980. Nasanov pheromone of the honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Part I. Chemical characterization. *Journal of Chemical Ecology*, 6: 425-436. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9505-4>.
- Renou, M., 2014. Pheromones and General Odor Perception in Insects, p. 23-56 - Mucignat-Caretta C, editor. *Neurobiology of Chemical Communication*. Boca Raton (FL): CRC Press, 612 p.
- Seeley, T.D. & S.C. Buhrman, 2001. Nest-site selection in honey bees: how well do swarms implement the “best-of-N” decision rule? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49: 416-427. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002650000299>.
- Seeley, T.D., P. Kirk & K.M. Passino, 2006. Group decision making in honeybee swarms. *American Scientist*, 94: 220-229. DOI: <https://doi.org/10.1511/2006.3.220>.
- Thiéry, D. & F. Marian-Poll, 1998. Electroantennogram responses of Douglas-fir seed chalcids to plant volatiles. *Journal Insect*

Physiology, 44: 483-490. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(97\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00164-9).  
Winston, M.L., 1987. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 294 p.  
Wray, M.K. & T.D. Seeley, 2011. Consistent personality differences in house-huting behavior but not decision speed in swarms of honey bees (*Apis mellifera*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 65: 2061-2070. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1215-1>.

Wright, G.A., M. Carlton & B.H. Smith, 2009. A Honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration. Behavioral Neuroscienc, 123: 36-43. DOI: <https://doi.org/10.1037/a0014040>.

\*\*\*\*\*

**Suggestion citation:**

Pires, P.D.S., J. Sant'Ana & R. Bisotto-de-Oliveira, 2018. Respostas eletroantegráficas e comportamentais de abelhas africanizadas, *Apis mellifera* (Linnaeus), ao feromônio de Nasanov e ao óleo essencial de capim-limão. EntomoBrasilis, 11 (2): 70-77.

**Available on:** [doi:10.12741/ebrasilis.v11i2.769](https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v11i2.769)

